

**Die CCN Proteine CCN1 (CYR61)
und CCN3 (NOV):
Regulatoren der Trophoblastproliferation und –migration**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Friederike Kipkeew
aus Herdecke

September 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Elke Winterhager

2. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Verena Jendrossek

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 2014

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XII
TABELLENVERZEICHNIS	XIV
1. EINLEITUNG	15
1.1 Die humane Plazenta.....	15
1.1.1 Aufbau und Funktion der humanen Plazenta	15
1.1.2 Differenzierung des Trophoblasten	16
1.1.3 Die Präeklampsie als Beispiel für schwerwiegende Störungen der Plazentation.....	18
1.1.4 Regulation des Ausstiegs der Trophoblastzellen aus dem Zellzyklus und des invasiven Differenzierungsweges	19
1.1.5 Die Zelllinie SGHPL-5 als Modellsystem für die Untersuchung plazentarer Trophoblastzellfunktionen.....	21
1.1.6 Zellzyklusregulation im humanen Trophoblasten	22
1.1.7 Signaltransduktionswege der Trophoblastinvasion und Proliferation.....	27
1.1.7.1 Der Notch-Rezeptor und -Signalweg.....	27
1.1.7.2 Integrin-Rezeptoren	28
1.1.7.3 Die Fokale Adhäsionskinase (FAK)	29
1.1.7.4 Der Phosphoinositid-3-kinase (P13K)/ Akt - Signalweg.....	30
1.1.7.5 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs)	31
1.2 Die CCN Protein-Familie.....	32
1.2.1 CCN1 (cysteine-rich, angiogenic inducer 61; CYR61).....	33
1.2.2 CCN3 (nephroblastoma overexpressed; NOV)	34
1.2.3 Die Rolle von CCN1 und CCN3 in der embryonalen Entwicklung und Plazentation	35
1.3 Zielsetzung	37
2. MATERIAL UND METHODEN	39

2.1 Material	39
2.1.1 Antikörper.....	39
2.1.2 Oligonukleotide	41
2.1.3 Enzyme	43
2.1.5 Größenstandards	44
2.1.6 Rekombinante Proteine.....	44
2.1.7 Reaktionskits	44
2.1.8 Geräte.....	45
2.1.9 Feinchemikalien.....	46
2.1.10 Software und Server	48
2.2 Methoden	50
2.2.1 Kultivierung der Zelllinien	50
2.2.2 Subkultivierung/ Passagieren von Zellen	50
2.2.3 Bestimmung der Zellzahl.....	51
2.2.4 Kryokonservierung von Zellen.....	51
2.2.5 Behandlung der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 mit rekombinanten Proteinen.....	51
2.2.6 Inhibierung des Notch-1 Signalweges in der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 mit dem γ -Sekretaseinhibitor DAPT.....	52
2.2.7 Inhibierung des Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Signalweges in der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 mit Integrin $\alpha 5$ siRNA	52
2.2.8 Herstellung eines Doxzyklin-induzierbaren Überexpressionssystems für CCN3 in der Zelllinie SGHPL-5 (SGHPL-5/tetO-CCN3) durch lentivirale Gentransduktion	52
2.2.9 <i>In vitro</i> Proliferationsassay	54
2.2.10 Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung	54
2.2.11 Apoptosedetektion mittels Annexin V Markierung und durchflusszytometrischer Analyse	55
2.2.12 Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität	56
2.2.13 Bestimmung der Zellmigration mittels Wundheilungsassay.....	56
2.2.14 Immunzytochemie	57
2.2.15 Isolierung von RNA.....	57
2.2.16 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	58
2.2.17 Reverse Transkription (RT).....	58
2.2.18 DNA-Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	59
2.2.19 DNA-Gelelektrophorese	61

2.2.20 Aufreinigung der PCR-Produkte	61
2.2.21 Herstellung von Standardreihen für die quantitative Real-Time PCR	62
2.2.22 Quantitative Real-Time PCR.....	62
2.2.23 Proteinextraktion aus Zelllinien.....	64
2.2.24 Protein-Konzentrationsbestimmung	64
2.2.25 Diskontinuierliche SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE)	65
2.2.26 Transfer der Proteine auf eine Membran - Semidry Western Blot.....	66
2.2.27 Detektion und Visualisierung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	67
2.2.28 Statistische Auswertungen der Expressionsdaten.....	68
 3. ERGEBNISSE	69
 3.1 Expression von CCN1 und CCN3 und von Trophoblast-spezifischen Genen in der humanen Trophoblastzelllinie SGHPL-5.....	69
 3.2 Doxyzyklin-induzierbare Überexpression von CCN3 in lentiviral transduzierten SGHPL-5/ tetO-CCN3	71
 3.2 Proliferation	73
3.2.1 CCN1 und CCN3 haben eine proliferationshemmende Wirkung auf SGHPL-5 Trophoblastzellen	73
3.2.2 CCN1 und CCN3 aktivieren den Notch1 Rezeptor und die Expression seines Zielgens p21 ^{Waf1/Cip1}	79
3.2.3 Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Expression von Zellzyklusregulatoren ...	82
3.2.4 Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die zelluläre Seneszenz	87
 3.3 Migration.....	92
3.3.1 CCN1 und CCN3 verstärken das Migrationsverhalten von SGHPL-5 Zellen durch Signalübermittlung über den $\alpha 5\beta 1$ Integrin Rezeptor	92
3.3.2 Die Signalübermittlung von CCN1 und CCN3 über die Aktivierung von FAK und Akt erfolgt möglicherweise durch Interaktion mit dem Integrin $\alpha 5\beta 1$	94
 4. DISKUSSION	101
 4.1 Die benigne Trophoblastzelllinie SGHPL-5 als Modellsystem zur Untersuchung der Proliferations- und Migrationsregulation des extravillösen Trophoblasten	101

4.2 Der Einfluss des Glykosylierungsstatus von CCN1 und CCN3 auf das zellphysiologische Verhalten von Trophoblastzellen	103
4.3 Regulation der Proliferationseigenschaften von SGHPL-5 Trophoblastzellen durch CCN1 und CCN3	105
4.3.1 CCN1 und CCN3 haben eine proliferationshemmende Wirkung auf SGHPL-5 Trophoblastzellen	105
4.3.2 Die proliferationshemmende Wirkung von CCN1 und CCN3 erfolgt vermutlich über den Notch1 Rezeptor und dessen Zielgen p21 ^{Waf1/Cip1}	106
4.3.3 CCN1 und CCN3 induzieren neben der gleichzeitigen Akkumulierung von p21 ^{Waf1/Cip1} und D1 auch den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor und Seneszenz-Marker p16 ^{INK4A} sowie eine verstärkte Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität	108
4.4 Migration.....	111
4.4.1 CCN1 und CCN3 verstärken das Migrationsverhalten von SGHPL-5 Zellen vermutlich durch Signalübermittlung über den Integrin $\alpha 5\beta 1$ Rezeptor.....	111
4.4.2 Die Signalübermittlung von CCN1 und CCN3 über den Integrin $\alpha 5\beta 1$ Rezeptor erfolgt über die Aktivierung von FAK und Akt	112
4.5 Ausblick.....	114
5. ZUSAMMENFASSUNG	117
6. LITERATURVERZEICHNIS	119
LEBENS LAUF	135
ERKLÄRUNGEN	136
DANKSAGUNG	137

Abkürzungsverzeichnis

× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s ²)
μ	Mikro (als Präfix)
7-AAD	7-Aminoactinomycin
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
AVSD	Atrioventrikulärer Septumdefekt
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (engl.: <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (engl.: <i>cyclin-dependent kinase</i>)
CDKI	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor (engl.: <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>)
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
CK7	Zytokeratin 7 (engl.: <i>cytokeratin 7</i>)
CT	<i>cysteine knot containing family of growth regulator</i>
CTB	Zytotrophoblast (engl.: <i>cytotrophoblast</i>)
Cx	Connexin
CYR61	<i>cysteine-rich, angiogenic inducer, 61</i>
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLL	<i>delta-like ligand</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxzyklin
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl.: <i>extracellular matrix</i>)
EDTA	N, N, N', N' Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition

ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EVT	extravillöser Trophoblast
f	Femto (als Präfix)
FACS	durchflusszytometrische Analyse (engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FAK	fokale Adhäsionskinase (engl.: <i>focal adhesion kinase</i>)
FCS	fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Gauge (Maßeinheit für Injektionsnadeln)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (engl.: <i>G protein-coupled receptor</i>)
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
g-rhCCN1/3	glykosyliertes rekombinantes humanes CCN1/3
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLA-G	<i>human leukocyte antigen G</i>
hPL	humanes plazentares Laktogen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>High-performance liquid chromatography</i>)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSGP	Heparansulfat-Proteoglykan
ICC	Immuncytochemie
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IgG	Immunglobulin G
ITGA5	Integrin alpha 5
ITGB1	Integrin beta 1
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung (engl.: <i>intrauterine growth restriction</i>)
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k	Kilo (als Präfix)
kb	Kilobasen
M	molar
m	milli (als Präfix)
mA	Milliampère
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MAV1	<i>myeloblastosis-associated virus type 1</i>
MEK	<i>MAP kinase or ERK kinase</i>
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
n	Nano (als Präfix)
NECD	extrazelluläre Notch Domäne (engl.: <i>notch extracellular domain</i>)
ng-rhCCN1/3	unglykosylierte rekombinantes humanes CCN1/3
NICD	intrazelluläre Notch Domäne (engl.: <i>notch intracellular domain</i>)
NOV	<i>nephroblastoma overexpressed</i>
OD	optische Dichte
P	Überschreitungswahrscheinlichkeit/ Signifikanzwert (engl.: <i>probability value</i>)
p	Pico (als Präfix)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
P16	p16 ^{INK4A}
P27	p27 ^{Kip1}
P57	p57 ^{Kip2}
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (engl.: <i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>)
PGE2	Prostaglandin E2
PIP	Phosphatidylinositol-Phosphat
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (engl.: <i>quantitative real-time reverse transcription-PCR</i>)
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Rb	Retinoblastomprotein
RBPjk	<i>recombination signal-binding protein 1 for J-kappa</i>
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase

rtTA	<i>reverse tetracycline-responsive transcriptional activator</i>
S6K	p70 S6 Kinase
SA- β -gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität
SDS	Natriumdodecylsulphat (engl.: <i>sodium dodecylsulphate</i>)
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SGHPL-5	<i>Saint Georges Hospital Placental Cell Line - 5</i>
SH2	<i>SRC homology 2</i>
Src	<i>Cellular sarcoma tyrosine kinase</i>
STB	Synzytotrophoblast
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBS-T	TBS-Tween
TCF	T-Zell spezifische Transkriptionsfaktorfamilie (engl.: <i>T cell-specific transcription factor family</i>)
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin
Tet	Terazyklin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP	Gewebeinhibitor der Metalloproteinasen (engl.: <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>)
TM	Transmembrandomäne
Tm	Schmelztemperatur
TRE	<i>tet responsive element</i>
TSP-1	<i>thrombospondin type 1 repeat</i>
tTA	<i>tetracycline-responsive transcriptional activator</i>
U	Einheit der Enzymaktivität (engl.: <i>unit</i>)
ü.N.	über Nacht
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent (engl.: <i>volume per volume</i>)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VWC	<i>von Willebrand factor type C</i>
w/v	Gewichtsprozent (engl.: <i>weight per volume</i>)
WB	Western Blot
WISP	<i>Wnt-induced secreted protein</i>

Wnt	<i>wingless-type MMTV integration site family</i>
Y	Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Querschnitt durch die reife humane Plazenta.	16
Abb. 2: Differenzierung der proliferativen Trophoblastzellen der plazentaren Zellsäule in den invasiven, nicht-proliferativen Phänotyp.	17
Abb. 3: Störung der Plazentation in der Präeklampsie.	19
Abb. 4: Zusammenhang der Cyclin-Expression und der Phasen und Kontrollpunkte des eukaryotischen Zellzyklus.	22
Abb. 5: Cyclin D1-CDK4/6 Regulation des G1/S-Kontrollpunktes.	23
Abb. 6: p21 ^{Waf1/Cip1} – vermittelte Stabilisierung des Cyclin D1 - CDK4/6 Komplexes bei zellulärer Seneszenz.	25
Abb. 7: Modulare Struktur der CCN Proteinfamilie.	33
Abb. 8: Expression von Trophoblast-spezifischen Genen sowie CCN1 und CCN3 in der Zelllinie SGHPL-5	69
Abb. 9: Doxyzyklin-induzierbare Überexpression von CCN3 in lentiviral transfizierten SGHPL-5/tetO-CCN3	72
Abb. 10: CCN1 und CCN3 haben eine proliferationshemmende Wirkung auf die Trophoblastzelllinie SGHPL-5	74
Abb. 11: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die Zellablösung und frühe Apoptose von SGHPL-5 Zellen	75
Abb. 12: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die Proteinexpression von phospho-p53 und Caspase-3 in SGHPL-5 Zellen	76
Abb. 13: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die Zellzyklusphasenverteilung und die Polyploidie der SGHPL-5 Zellen	78
Abb. 14: CCN1 und CCN3 fördern die Aktivierung des Notch1 Rezeptor und die Hochregulierung von p21 ^{Waf1/Cip1}	80
Abb. 15: Auswirkung einer achtstündigen γ -Sekretase-Inhibierung durch 10 μ M DAPT auf die Notch1-abhängige p21 ^{Waf1/Cip1} -Regulation in SGHPL-5 Zellen.	81
Abb. 16: Auswirkung einer 48-stündigen γ -Sekretase-Inhibierung durch 100 μ M DAPT auf die Notch1-abhängige p21 ^{Waf1/Cip1} -Regulation in SGHPL-5 Zellen.	82
Abb. 17: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die mRNA Expression der Zellzyklusregulatoren p15 ^{INK4B} , p16 ^{INK4A} , p27 ^{Kip1} und p57 ^{Kip2}	83

Abb. 18: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die Proteinexpression von p27^{Kip1} nach 2 h und 8 h	84
Abb. 19: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die Proteinexpression von p57^{Kip2} nach 2 h und 8 h	85
Abb. 20: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf das Proteinexpressionslevel von Cyclin D1 und phosphoryliertem Retinoblastoma Protein in SGHPL-5 nach 2 h und 8 h	86
Abb. 21: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Proteinexpression von Cyclin D1, phosphoryliertem Rb, p16^{INK4A} und p21^{Waf1/Cip1} in SGHPL-5 Zellen nach 2 h, 24 h und 48 h	89
Abb. 22: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Proteinexpression von Cyclin D1, phosphoryliertem Retinoblastoma Protein, p16^{INK4A} und p21^{Waf1/Cip1} in SGHPL-5 Zellen nach 2 h, 24 h und 48 h (exemplarischer Western Blot zu Abb. 21)	90
Abb. 23: CCN1 und CCN3 induzieren die Seneszenz in SGHPL-5 Trophoblastzellen...	91
Abb. 24: CCN1 erhöht das Migrationsverhalten von SGHPL-5 Trophoblastzellen über das Integrin $\alpha 5 \beta 1$	93
Abb. 25: CCN3 erhöht das Migrationsverhalten von SGHPL-5 Trophoblastzellen über das Integrin $\alpha 5 \beta 1$	94
Abb. 26: Relative mRNA Expression der Integrin-Untereinheiten Integrin $\alpha 5$ und Integrin $\beta 1$ in der Trophoblastzelllinie SGHPL-5	95
Abb. 27: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Aktivierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK)	96
Abb. 28: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Aktivierung der P13K/ Akt Kinase	97
Abb. 29: Relative mRNA Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 in SGHPL-5 Trophoblastzellen	98
Abb. 30: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Aktivierung der ERK 1/2 MAP Kinasen	99
Abb. 31: Auswirkung eines siRNA-Knockdowns von Integrin $\alpha 5$ auf die CCN1 und CCN3 abhängige Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase FAK und der P13k/ Akt Kinase	100
Abb. 32: Regulation der Trophoblastproliferation durch CCN1 und CCN3	110
Abb. 33: Regulation der Trophoblastmigration durch CCN1 und CCN3	114

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete primäre Antikörper.....	39
Tab. 2: Verwendete sekundäre Antikörper.....	40
Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide.....	41
Tab. 4: Verwendete Enzyme	43
Tab. 5: Verwendete Größenstandards	44
Tab. 6: Verwendete rekombinante Proteine.....	44
Tab. 7: Verwendete Reaktionskits	44
Tab. 8: Verwendete Geräte	45
Tab. 9: Verwendete Feinchemikalien	46
Tab. 10: Verwendete Software und Server	48

1. Einleitung

1.1 Die humane Plazenta

Die Plazenta hat als erstes während der Entwicklung von Säugetieren gebildetes Organ eine zentrale Bedeutung für das Wachstum und die Entwicklung des Embryos. Sie ist entscheidend für die Regulation des metabolischen und endokrinen Status im Uterus. Eine Dysregulation der plazentaren Entwicklung kann neben schwerwiegenden Schwangerschaftserkrankungen, wie der Präeklampsie und der intrauterinen Wachstumsretardierung (engl.: *intrauterine growth restriction*; IUGR) (Jauniaux et al. 2006) auch Konsequenzen haben, die die Gesundheit bis in das Erwachsenenalter nachhaltig negativ beeinflussen. So werden Herzmuskelerkrankungen, Schlaganfälle, Bluthochdruck und Diabetes mellitus mit Störungen in der plazentaren Entwicklung in Verbindung gebracht (Barker und Clark 1997). Ein grundlegendes Verständnis der molekularen Mechanismen der Plazentaentwicklung ist daher von großer Bedeutung.

1.1.1 Aufbau und Funktion der humanen Plazenta

Die humane Plazenta ist ein transientes Organ aus fetalen und maternalen Gewebeanteilen, das während der gesamten Schwangerschaft der kontinuierlichen Versorgung des sich entwickelnden Fetus mit Nährstoffen und Sauerstoff aus dem maternalen Stoffwechsel sowie der Entsorgung von fetalen metabolischen Abfallprodukten und Kohlendioxid dient (Cross 1998). Darüber hinaus sorgt sie für die Produktion verschiedener Hormone und Wachstumsfaktoren sowie dem Schutz des Fetus vor dem maternalen Immunsystem (Regnault et al. 2002). Bereits mit der Implantation der Blastozyste beginnt die Entstehung der Plazenta durch die Einwanderung des fetalen Trophoblasten in das maternale Endometrium. Der Implantationsort wird als Decidua basalis bezeichnet und bildet später den maternalen Anteil der Plazenta. Der fetale Anteil der reifen Plazenta besteht aus der Chorionplatte an der die fetalen Gefäße aus der Nabelschnur in die Stammzotten münden, die sich bis in die peripher gelegenen Terminalzotten zu ausgewachsenen Zottenbäumen verzweigen. Stammzotten, die an der gegenüberliegenden dezidualen Basalplatte verankert sind, bezeichnet man als Haftzotten. Dazwischen befindet sich der mit maternalem Blut gefüllte intervillöse Raum (siehe **Abb. 1**).

In der hämochorialen Plazenta sind die maternale und die fetale Blutzirkulation durch das fetale Chorion klar getrennt, dies wird auch als Plazentarschranke bezeichnet.

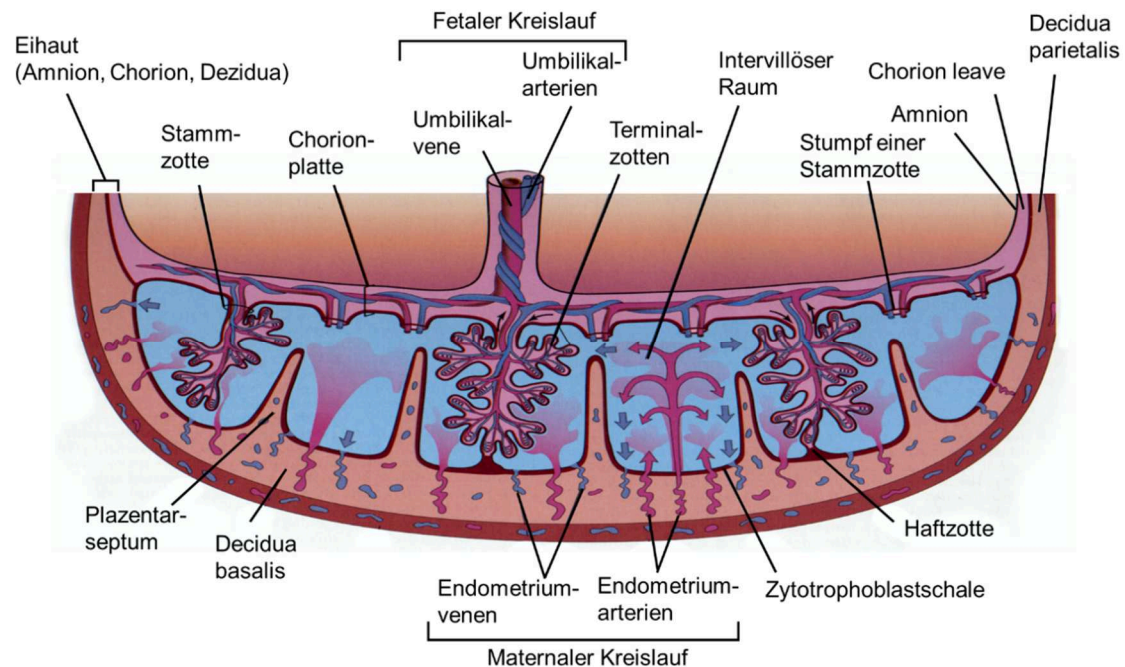


Abb. 1: Schematischer Querschnitt durch die reife humane Plazenta.

Die reife humane Plazenta besteht aus fetalen und maternalen Gewebeanteilen. Der fetale Anteil besteht aus der Chorionplatte und der Nabelschnur, aus der die fetalen Gefäße in die Stammzotten münden, die sich bis in die peripheren Terminalzotten zu ausgewachsenen Zottenbäumen verzweigen. Der maternale Anteil besteht aus der Decidua basalis, die durch Plazentar-septen den intervillösen Raum in Korymben unterteilt (verändert nach: Moore 2007).

1.1.2 Differenzierung des Trophoblasten

Der fetale Trophoblast durchläuft während der Entwicklung der Plazenta einen komplexen Weg der Differenzierung und bildet den Ursprung für verschiedene Trophoblastzellpopulationen mit jeweils spezifischen Aufgaben. Die Zytotrophoblastzellen (engl.: *cytotrophoblast*; CTBs) sind der Ursprung sowohl für die villösen als auch für die extravillösen Zellpopulationen (Ohlsson 1989). Die villösen CTBs dienen dabei als Stammzellen und fusionieren zu den multinukleären Synzytotrophoblastzellen (STBs), die die Stammzotten bedecken und vorrangig an der Produktion von Schwangerschaftshormonen und dem Austausch von Nährstoffen und metabolischen Abfallprodukten beteiligt sind (Lunghi et al. 2007; Ji et al. 2012). In den Haftzotten proliferieren die Zytotrophoblastzellen weiter zu plazentaren Zellsäulen, die sich an

die uterine Wand anheften (Enders 1968; Red-Horse et al. 2004; Knöfler 2010; Ji et al. 2012). Die proliferierenden Zellen der Zellsäule bilden den Ursprung für die extravillösen Trophoblastzellen (EVTs), die als interstitielle oder endovaskuläre EVTs in die maternale Dezidua einwandern (Pijnenborg et al. 1980; Lyall 2006; Ji et al. 2012). Der Ausstieg aus dem Zellzyklus und die anschließende Differenzierung in interstitielle EVTs scheint durch den Kontakt mit der extrazellulären Matrix des endometrialen Stromas beeinflusst zu werden (Knöfler 2010). Die invasiven Trophoblastzellen produzieren ebenfalls Schwangerschaftshormone, wie humanes Choriongonadotropin (hCG) und humanes plazentares Laktogen (hPL) und differenzieren schließlich in polyploide Trophoblast-Riesenzellen (engl.: *trophoblast giant cells*; GC) (Pijnenborg et al. 1980; Genbacev et al. 1993; Zybina et al. 2002; Handschuh et al. 2007).

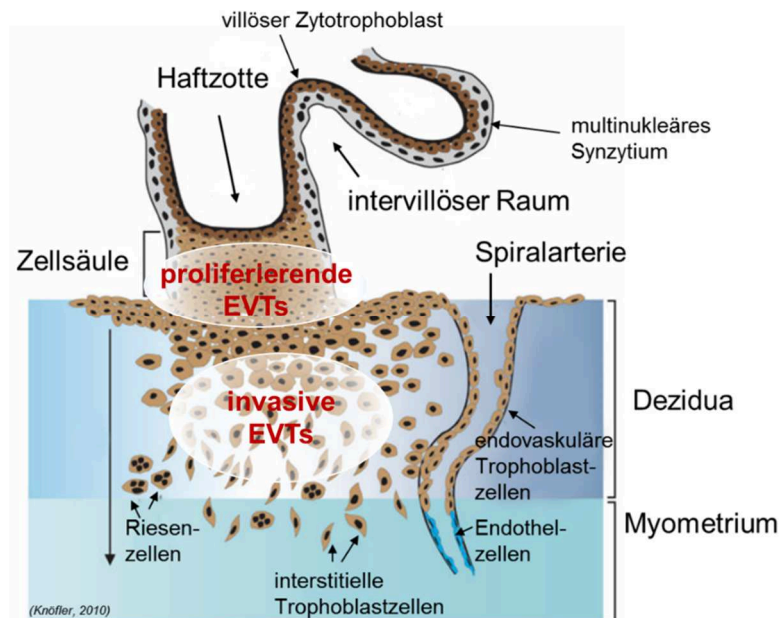


Abb. 2: Differenzierung der proliferativen Trophoblastzellen der plazentaren Zellsäule in den invasiven, nicht-proliferativen Phänotyp.

Villöse Zytotrophoblastzellen fusionieren, um ein multinukleäres Synzytium zu bilden oder dienen als Vorgänger für die proliferativen extravillösen Trophoblastzellen (EVTs) der plazentaren Zellsäule. Die EVT's der plazentaren Zellsäule verlassen bei Kontakt mit der maternalen Dezidua den Zellzyklus und differenzieren in einen invasiven, nicht mehr proliferierenden Phänotyp, der durch die Dezidua bis in das innere Drittel des Myometriums (interstitielle EVT's) oder in die Spiralarterien (endovaskuläre EVT's) einwandert. Interstitielle EVT's können in tieferen Regionen der Dezidua oder des Myometriums zu Trophoblast-Riesenzellen differenzieren (verändert nach: Knöfler 2010).

Der andere Teil der EVT's spielt als endovaskuläre EVT's eine bedeutende Rolle im vaskulären Umbau der uterinen Spiralarterien. Die endovaskulären EVT's wandern in die uterinen

Spiralarterien ein, ersetzen die maternalen Endothelzellen und übernehmen endothelartige Eigenschaften und Funktionen (Pijnenborg et al. 1983; Zhou et al. 1997; Damsky und Fisher 1998; Harris und Aplin 2007). Dies führt zu einer Umwandlung der uterinen Spiralarterien zu uteroplazentaren Gefäßen mit stark vergrößertem Gefäßdurchmesser und geringem Widerstand, die eine adäquate Durchblutung des intervillösen Raumes ermöglichen, um den Bedürfnissen des Embryo gerecht zu werden (Lyall 2006). Fehlfunktionen und Störungen in diesem komplexen System der Regulation der Trophoblastproliferation und der Differenzierung in den invasiven Phänotyp können zu schwerwiegenden Schwangerschaftserkrankungen führen. So wurden z.B. Fehlfunktionen beim Umbau der Spiralarterien und eine unzureichende interstitielle Invasion der Trophoblastzellen in den Plazenten von Schwangeren, die an einer Präeklampsie mit schwerer intrauteriner Wachstumsretardierung erkrankt sind, beschrieben (Khong et al. 1986; McFadyen et al. 1986; Pijnenborg et al. 1991).

1.1.3 Die Präeklampsie als Beispiel für schwerwiegende Störungen der Plazentation

Störungen in dem komplexen System der Plazentation können zu schwerwiegenden Schwangerschaftserkrankungen führen. Eine ungenügende Umwandlung der uterinen Spiralarterien (Zhou et al. 1997; Red-Horse et al. 2004) und unzureichende Invasion der interstitiellen Trophoblastzellen (Red-Horse et al. 2004; Noris et al. 2005) konnte z.B. bei präeklampsischen Patientinnen festgestellt werden (siehe **Abb. 3**). Die Präeklampsie tritt in 2 - 7 % aller Schwangerschaften auf und ist damit eine der häufigsten Ursachen für maternale und fetale Morbidität und Mortalität sowie Frühgeburtslichkeit (Cartwright et al. 2010). Die Präeklampsie wird typischerweise nach der 20. Schwangerschaftswoche durch eine Hypertonie ($\geq 160/110$ mmHg) und Proteinurie (≥ 5 g in 24 h) der Mutter diagnostiziert und wird oft durch weitere schwerwiegende Komplikationen wie Lungenödeme, Krampfanfälle, Oligurie (≤ 500 ml in 24 h), erhöhte Werte von Transaminasen in der Leber, Thrombozytopenie ($\leq 150.000/\mu\text{l}$), Hämolyse, epigastrischen Schmerzen, Schmerzen im oberen rechten Quadranten des Abdomens, sowie zerebralen Störungen (Kopfschmerzen und Sehstörungen) begleitet (Sibai 2003; Gaiser 2008). Bei einer schweren Präeklampsie ist nach wie vor die Beendigung der Schwangerschaft durch einen Kaiserschnitt, mit allen Konsequenzen einer Frühgeburt, die einzig verfügbare Behandlungsmethode. Eine unbehandelte Präeklampsie kann schwere gesundheitliche Folgen für Mutter und Fetus haben oder sogar zu deren Tod führen.

Untersuchungen zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Pathogenese der Präeklampsie sind daher von großer Bedeutung, um eine effektive frühe Diagnose und die Entwicklung präventiver und therapeutischer Strategien zur Minimierung der Komplikationen zu ermöglichen.

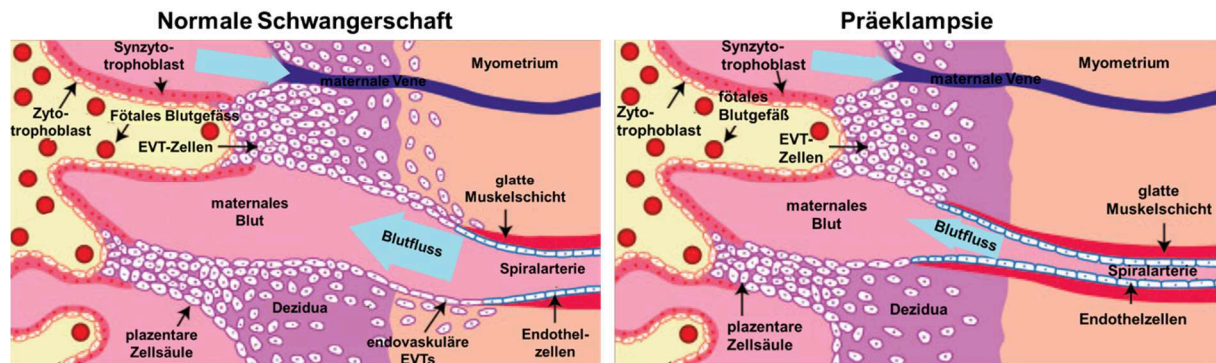


Abb. 3: Störung der Plazentation in der Präeklampsie.

Die präeklampsische Plazenta ist im Vergleich zur normalen Plazenta durch eine unzureichende Trophoblastinvasion und eine unzureichende Umwandlung der maternalen Spiralarterien gekennzeichnet (verändert nach: Lam et al. 2005).

1.1.4 Regulation des Ausstiegs der Trophoblastzellen aus dem Zellzyklus und des invasiven Differenzierungsweges

In normalen Schwangerschaften ist das Gleichgewicht zwischen den proliferierenden EVT's der plazentaren Zellsäule und den interstitiellen und endovaskulären EVT's, die in die maternale Dezidua einwandern, strikt durch ein komplexes System aus verschiedenen maternalen und vom Trophoblast stammenden Faktoren sowohl zeitlich als auch räumlich reguliert (Lala und Hamilton 1996; Bischof et al. 2000). Die interstitiellen und endovaskulären EVT's verlieren zunächst ihre proliferativen Eigenschaften und auch ihre Invasivität geht nicht über die Dezidua und das innere Drittel des darunterliegenden Myometriums hinaus. Migrierende, interstitielle EVT's exprimieren verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMPs), Cathepsine und den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), um die Zellmigration durch das Gewebe der Dezidua zu ermöglichen (Bischof et al. 2000; Lala und Chakraborty 2003; Varanou et al. 2006). Deziduale Zellen hingegen produzieren Gewebehinhibitoren der Metalloproteinasen (engl.: *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs) und den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI), um die Invasivität der interstitiellen EVT's zu begrenzen (Lala und Graham 1990; Schatz und Lockwood 1993). Auch interstitielle EVT's exprimieren TIMPs, PAI und MMPs (Feinberg

et al. 1989; Lala und Hamilton 1996; Bischof et al. 2000). Entlang des Invasionsweges ändert sich auch das Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle in den Trophoblastzellen (Damsky et al. 1994; Vicovac et al. 1995). Die CTBs der villösen Basalmembran exprimieren das Integrin $\alpha 6 \beta 4$. Die EVT's der plazentaren Zellsäule hingegen exprimieren das Integrin $\alpha 5 \beta 1$, das durch Bindung von Fibronektin zur Stabilisierung der Zellsäule beiträgt. In den interstitiellen EVT's fördert das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ vermutlich die Invasivität durch Interaktion mit Kollagenen und verschiedenen Lamininen, wie z.B. Laminin-2, das in hohem Maße in der Dezidua exprimiert wird (Church et al. 1996). Invadierende EVT's weisen außerdem durch eine transiente Unterdrückung der Expression des Adhäsionsproteins E-Cadherin (Zhou et al. 1997) Ähnlichkeiten zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) auf. Die EMT ist ein zentraler Vorgang der Embryonalentwicklung und der Tumorgenese. Durch Herunterregulierung von E-Cadherin verlieren polarisierte Epithelzellen dabei ihre epithelialen Eigenschaften, lösen ihre Zellkontakte auf und beginnen zu migrieren. Weiterhin weisen interstitielle EVT's eine nukleäre Expression von an der EMT beteiligten Transkriptionsfaktoren, wie Snail und der T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktorfamilie (engl.: *T cell-specific transcription factor family*; TCF), auf (Pollheimer et al. 2006). Anders als Krebszellen behalten migrierende Trophoblastzellen jedoch ihre epithelialen Eigenschaften, wie die Expression von Zytokeratin 7 (engl.: *cytokeratin 7*; CK7) und die Expression mesenchymaler Marker der EMT wie Vimentin bleibt aus. In der Tumorgenese nehmen epitheliale Zellen vorübergehend einen invasiven, metastasierenden Zellphänotyp an, der durch die Koexpression von mesenchymalen und epithelialen Genen gekennzeichnet ist, bevor sie in den mesenchymalen Phänotyp übergehen. Es ist daher möglich, dass interstitielle Trophoblastzellen einen Phänotyp aufweisen, der dem metastasierenden Phänotyp der Tumorgenese sehr ähnlich ist (Pollheimer et al. 2006). Die Beibehaltung von epithelialen Markern könnte zu einem kontrollierten Ausstieg aus dem Zellzyklus und der späteren Differenzierung in multinukleäre Trophoblast-Riesenzellen beitragen, die letztendlich auch durch die Expression von Proteaseinhibitoren die Einwanderung der Trophoblastzellen in die maternale Dezidua begrenzen (al-Lamki et al. 1999; Ji et al. 2012).

1.1.5 Die Zelllinie SGHPL-5 als Modellsystem für die Untersuchung plazentarer Trophoblastzellfunktionen

Um die Regulation des Ausstiegs der Trophoblastzellen aus dem Zellzyklus und des invasiven Differenzierungsweges zu untersuchen, bieten sich neben der Verwendung von Primärkulturen humaner Trophoblastzellen und plazentaren Explants, stabile humane Trophoblastzelllinien als eine gute Möglichkeit zur Untersuchung plazentarer Trophoblastzellfunktionen an. Man unterscheidet zwischen Trophoblastzelllinien mit verlängerter Lebensspanne durch spontane Transformation, Trophoblastzelllinien, die durch die Expression von exogenen Genen immortalisiert wurden und Trophoblastzelllinien, die aus Chorionkarzinomen stammen (Ji et al. 2012). Primärkulturen und plazentare Explants sind oft aus Gründen der Verfügbarkeit von plazentaren Geweben aus der frühen Schwangerschaft und aus ethischen Gründen begrenzt. Bei aus Chorionkarzinomen stammenden Zelllinien liegt nahe, dass diese eher einer Krebszelllinie ähnlich sind, als der ursprünglichen Trophoblastzelle. In dieser Arbeit wurde die plazentare Trophoblastzelllinie SGHPL-5 (engl.: *Saint Georges Hospital Placental cell Line-5*; SGHPL-5) verwendet. Die Zelllinie stammt aus plazentarem Ersttrimestergewebe und wurde durch Transfektion mit dem großen T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) immortalisiert (Choy und Manyonda 1998; Cartwright et al. 1999; Choy et al. 2000). SGHPL-5 Zellen sind mit einer auf 20 - 25 Passagen limitierten Lebensspanne kultivierbar und zeigen keine Transformationen, wie z.B. den Verlust der Kontaktinhibition (Shiverick et al. 2001). Zudem weisen SGHPL-5 Zellen die hinreichenden Charakteristika einer extravillösen Trophoblastzelllinie (hPL⁺, hCG⁺, CK7⁺, und HLA-G⁺) auf (King et al. 2000; Shiverick et al. 2001; Knöfler 2010). Die Expression der für den invasiven extravillösen Trophoblasten typischen Integrine $\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Zhou et al. 1997). Die Genexpressionsprofile von SGHPL-5 Zellen unterscheiden sich zwar von primären CTBs oder EVT_s, sind aber anderen aus EVT_s stammenden Trophoblastzelllinien, wie z.B. HTR8/SVneo, sehr ähnlich (Bilban et al. 2010). In zahlreichen Studien wurde die Zelllinie SGHPL-5 für die Untersuchung der Differenzierung des extravillösen Trophoblasten in den invasiven Phänotyp verwendet (Pollheimer et al. 2004; Pollheimer et al. 2005; Pollheimer et al. 2006; Saleh et al. 2007; Sonderegger et al. 2007; Bilban et al. 2010; van Dijk et al. 2010; Biadasiewicz et al. 2011; Pollheimer et al. 2011; Haslinger et al. 2013). SGHPL-5 Zellen exprimieren die Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2), die für die Invasion eine wichtige Rolle spielt (Pollheimer et al. 2004; Sonderegger et al. 2010). Darüber hinaus wurde die Zelllinie bereits erfolgreich für

die Untersuchung von an der Migration und Invasion beteiligter Signalkaskaden eingesetzt (Prast et al. 2008; Biadasiewicz et al. 2011; Haslinger et al. 2013).

1.1.6 Zellzyklusregulation im humanen Trophoblasten

Der eukaryotische Zellzyklus besteht aus zwei Phasen, der Teilung des Zellkerns (Mitose) und einer Wachstumsphase (Interphase). Die Interphase wird weiter in die G1-, S-, und G2-Phase unterteilt (siehe **Abb. 4A**). Die Kontrolle und Regulation des Zellzyklus erfolgt durch mitogene Wachstumsfaktoren, die durch Bindung an ihre jeweiligen Rezeptoren komplexe Signalkaskaden auslösen und letztlich in der Bildung von katalytischen Komplexen aus Cyclin-abhängigen Kinasen (engl.: *cyclin-dependent kinases*; CDKs), Cyclinen und deren Inhibitoren münden (Grana und Reddy 1995; Baker und Reddy 2012). Entsprechend ihres Auftretens in den Zellzyklusphasen, werden die Cycline in zwei Gruppen unterteilt: Die mitotischen Cycline A und B sowie die G1-Cycline D und E (Lew et al. 1991).

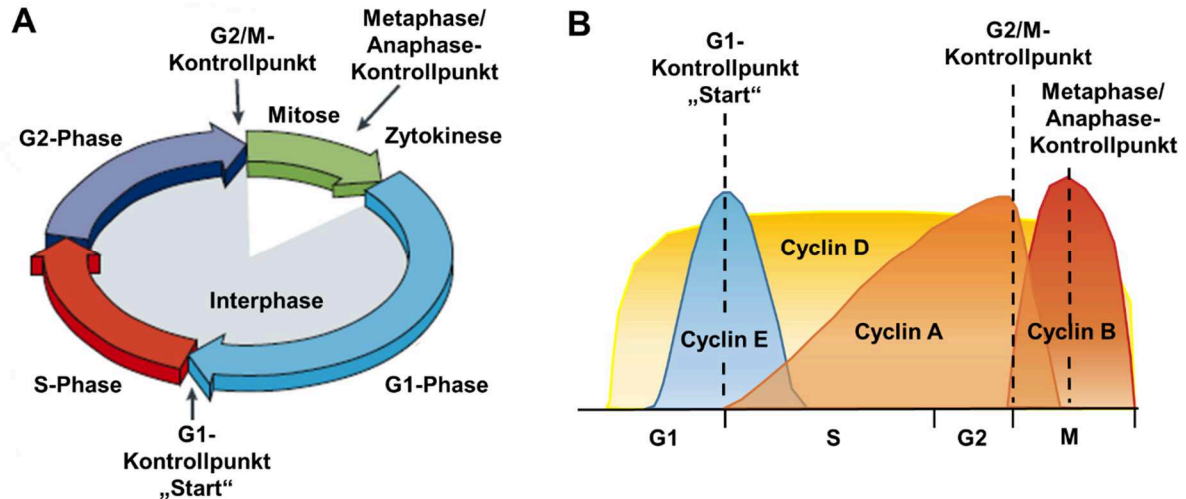


Abb. 4: Zusammenhang der Cyclin-Expression und der Phasen und Kontrollpunkte des eukaryotischen Zellzyklus.

(A) Der eukaryotische Zellzyklus wird durch drei Kontrollpunkte gegliedert. Der G1-Kontrollpunkt zu Beginn der S-Phase (S) initiiert die Replikation der DNA. Am G2/M-Kontrollpunkt beginnt die Mitose (M), die durch die Auflösung der Kernhülle und die Kondensation der Chromosomen gekennzeichnet ist. Die Trennung der Schwesterchromatiden findet am Metaphase/Anaphase-Kontrollpunkt statt. (B) Die zyklisch exprimierten Cycline regulieren in spezifischen Komplexen mit Cyclin-abhängigen Kinasen die Übergänge von der G1- in die S-phase und von der G2- in die M-Phase. Der Übergang von der Metaphase in die Anaphase wird durch die Degradierung von Cyclin B bestimmt (verändert nach: Hohegger et al. 2008).

Die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 binden die D-Cycline und vermitteln den Fortschritt der G1-Phase, um in Antwort auf mitogene Wachstumsfaktoren die DNA-Synthese zu initiieren. Der aktive Cyclin D - CDK4/6 Komplex sorgt für die Hyperphosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb), dessen hypophosphorylierte Form dann verschiedene andere Proteinfaktoren bindet, die durch die Phosphorylierung von Rb freigegeben werden (Kato et al. 1993; Weinberg 1995) (siehe **Abb. 5**). Dazu gehört unter anderem der Transkriptionsfaktor E2F, der wiederum die Transkription verschiedener Gene aktiviert, die für den Fortschritt der S-Phase sorgen (Bartek et al. 1996; Dyson 1998; Harbour und Dean 2000). Nachdem die Zelle den G1/S-Kontrollpunkt passiert hat, erfolgt eine weitere Phosphorylierung von Rb durch den Cyclin E – CDK2 Komplex, die Voraussetzung für die E2F Aktivierung ist (Koff et al. 1992; Sherr 1996; Harbour und Dean 2000). Die Aktivierung der E2F-vermittelten Transkription ermöglicht den Übergang der Zelle in die S-Phase. Nach dem Eintritt in die S-Phase, wird Cyclin E degradiert, sodass CDK2 nun Cyclin A binden kann. Während des Überganges von G1 zu S, agiert Cyclin A synergistisch mit Cyclin E/CDK2 um die DNA-Replikation zu initiieren (Krude et al. 1997; Harbour und Dean 2000). Cyclin A/CDK2 kontrolliert das Durchlaufen der G2-Phase, bevor der Komplex aus Cyclin B und CDK1 die Initiierung der Mitose bewirkt (Dunphy und Newport 1988).

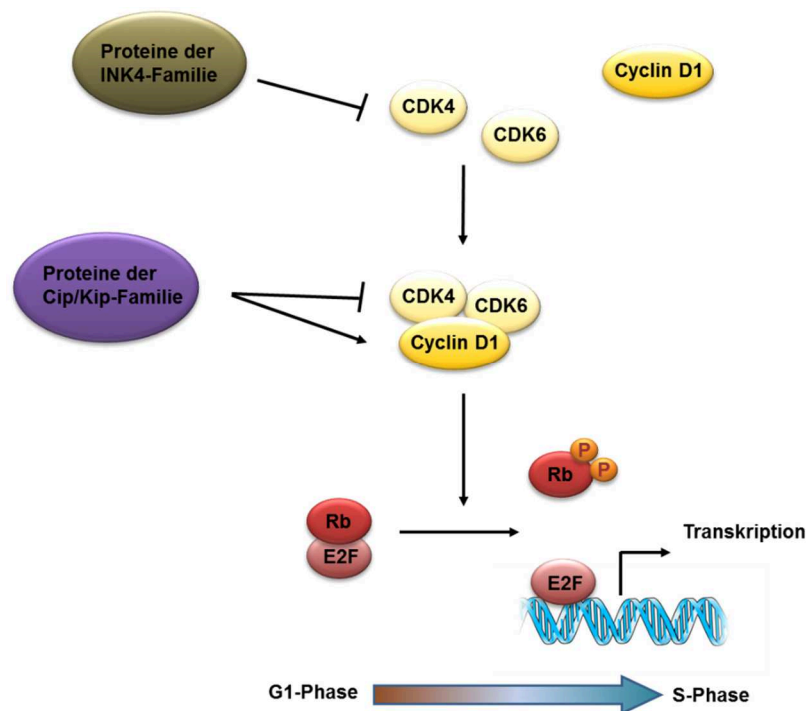


Abb. 5: Cyclin D1-CDK4/6 Regulation des G1/S-Kontrollpunktes.

Cyclin D1 bildet einen Komplex mit CDK4 und CDK6, der Rb phosphoryliert und den Übergang von G1 in die S-Phase aktiviert (verändert nach: Kondo et al. 2006; Baker und Reddy 2012).

Die Aktivierung von CDK4/6 durch die Komplexbildung mit D-Cyclinen (D1, D2 und D3) ist in vielen Zellarten ein zentraler Prozess der durch Wachstumsfaktoren stimulierten Zellzyklusregulation. Neben der Bindung durch Cycline, wird die Aktivität dieser Komplexe auch durch spezifische Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (engl.: *cyclin-dependent kinase inhibitors*; CDKIs) reguliert (Hunter und Pines 1994). CDKIs werden in zwei Familien unterteilt, die INK4- und die Cip/Kip-Inhibitoren. Die INK4 Familie beinhaltet p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D}, die spezifisch die CDK4/6-Komplexe inhibieren (Sherr und Roberts 1995; Canepa et al. 2007). Die INK4-Proteine werden durch wachstumsinhibierende Stimuli, wie Kontaktinhibierung, Seneszenz oder Behandlung mit TGF- β induziert (Baker und Reddy 2012). Insbesondere p16^{INK4A} spielt in diesem Kontext eine zentrale Rolle und gilt Marker für die zelluläre Seneszenz (Krishnamurthy et al. 2004). Zur Cip/Kip-Familie gehören p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}, die ein breiteres Spektrum an Cyclin-CDK Komplexen, wie Cyclin E-CDK2, Cyclin A-CDK2 und Cyclin B-CDK1 Komplexe binden und inhibieren (el-Deiry et al. 1993; Gu et al. 1993; Harper et al. 1993; Polyak et al. 1994; Toyoshima und Hunter 1994; Lee et al. 1995). Niedrige Expressionslevel dieser Proteine binden und stärken die Bildung der Cyclin-CDK Komplexe, während hohe Expressionslevel die Aktivität der CDKs inhibieren (Pateras et al. 2009). p21^{Waf1/Cip1} kann einen Arrest des Zellzyklus in der G1- und in der G2-Phase vermitteln und wird in Antwort auf Stress-induzierte DNA-Schädigungen entweder auf einem p53-abhängigen oder einem p53-unabhängigem Weg induziert (Lepley und Pelling 1997; Aliouat-Denis et al. 2005). Eine erhöhte Expression von p21^{Waf1/Cip1} wird vor allem mit einem Zellzyklusarrest vor der terminalen Differenzierung in Verbindung gebracht (Parker et al. 1995). p27^{Kip1} inhibiert Cyclin-CDK Komplexe der G1-Phase (Polyak et al. 1994; Polyak et al. 1994; Toyoshima und Hunter 1994). Ein Ausstieg aus dem Zellzyklus kann mit der Akkumulation von p27^{Kip1} einhergehen, das schnell degradiert wird, wenn die Zelle aus der Quieszenz, einem reversiblen Ruhezustand, wieder in den Zellzyklus eintritt (Chu et al. 2008). p57^{Kip2} interagiert ähnlich wie p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} mit Cyclin-CDK Komplexen, es zeichnet sich durch hohe Expressionslevel während der G0- und G1- Phase aus, die beim Übergang von der G1- in die S-Phase konsistent mit der Aktivierung der entsprechenden Cyclin-CDK-Komplexe abfallen (Polyak et al. 1994; Toyoshima und Hunter 1994). Hohe Expressionslevel von p57^{Kip2} bewirken einen G1-Arrest (Joaquin und Watson 2003). p57^{Kip2} wird mit terminal differenzierten Zellen (Yan et al. 1997), sowie der Endoreduplikation und Polyploidie in Verbindung gebracht (Hattori et al. 2000). Im Gegensatz zur Proliferation sind die postmitotischen zellbiologischen Zustände der terminalen Differenzierung, Quieszenz und Seneszenz durch einen Ausstieg aus dem Zellzyklus gekennzeichnet. Die Quieszenz, auch G0-

Phase des Zellzyklus, ist als einzige Form reversibel und erlaubt unter bestimmten Bedingungen einen Wiedereintritt in den Zellzyklus (Sang et al. 2008). Terminal differenzierte Zellen haben nach der klassischen Definition ihre Fähigkeit zur Proliferation irreversibel verloren und übernehmen spezialisierte Funktionen (Sacco et al. 2000). Die zelluläre Seneszenz ist ebenfalls ein irreversibler Arrest des Zellzyklus (Hayflick und Moorhead 1961; Takahashi et al. 2007). Man unterscheidet die replikative Seneszenz, die nach wiederholten Zellteilungen durch Verkürzung der Telomere auftritt (Campisi 1997) und die stressinduzierte prämatüre Seneszenz (Serrano et al. 1997; Toussaint et al. 2000). Charakteristische Merkmale der Seneszenz sind stark vergrößerte Zellen (Hayflick 1965), die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) (Dimri et al. 1995) und die Expression des Seneszenz-Markers $p16^{\text{INK4A}}$, die in quieszenten und terminal differenzierten Zellen gewöhnlich nicht auftritt (Alcorta et al. 1996; Hara et al. 1996; Serrano et al. 1997; Brenner et al. 1998).

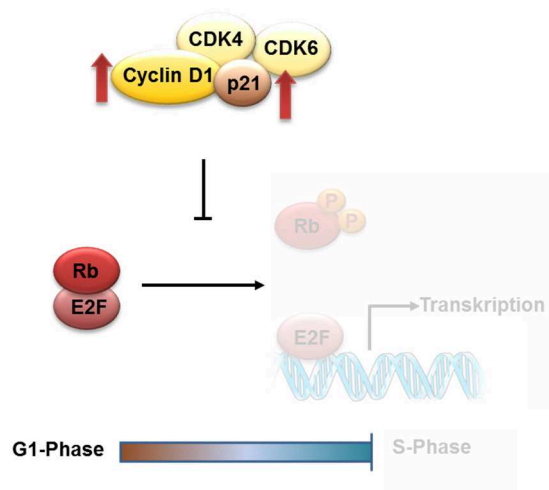


Abb. 6: $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ – vermittelte Stabilisierung des Cyclin D1 - CDK4/6 Komplexes bei zellulärer Seneszenz.

In seneszenten Zellen haben erhöhte Cyclin D1- Expressionslevel durch Stabilisierung von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ einen negativen Effekt auf den Zellzyklus (verändert nach: Kondo, Ezzat et al. 2006).

In seneszenten Zellen mit einem hohem Expressionslevel an Cyclin D1 schlägt die Phosphorylierung von Rb in Antwort auf mitogene Stimuli fehl (Atadja et al. 1995), wenn nahezu alle Cyclin D1-CDK Komplexe mit $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ assoziiert sind (Dulic et al. 1993) (siehe **Abb. 6**). Nur auf einem niedrigen Expressionslevel scheint Cyclin D1 das Durchlaufen des Zellzyklus durch Phosphorylierung und damit einhergehende Neutralisierung der inhibitorischen Aktivität von Rb zu fördern. Erhöhte Cyclin D1 Expressionslevel wirken sich jedoch durch die Stabilisierung von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ und die daraus folgende Inhibierung der

Phosphorylierung von Rb durch den Cyclin D1-CDK Komplexes negativ auf den Zellzyklus aus, es resultiert ein Zellzyklusarrest (Burton et al. 2007; Burton 2009). Die Akkumulierung von Cyclin D1 in seneszenten Zellen könnte auf das erhöhte $p21^{Waf1/Cip1}$ zurückzuführen sein (Alt et al. 2002). Der Anstieg von Cyclin D1 inhibiert die Proteasom vermittelte Degradierung von $p21^{Waf1/Cip1}$ (Coleman et al. 2003). Zu Beginn der Seneszenz ist $p21^{Waf1/Cip1}$ erhöht und fördert die nukleäre Akkumulierung von Cyclin D1, wodurch wiederum $p21^{Waf1/Cip1}$ stabilisiert und dessen weitere Akkumulierung gefördert wird (Burton et al. 2007; Burton 2009). Der Ausstieg der Trophoblastzellen aus dem Zellzyklus und die Differenzierung in den invasiven Phänotyp sind zentrale Prozesse der Plazentation, die von der exakten Koordination der Proliferations-, Differenzierungs- und Invasionseigenschaften der Trophoblastzellen abhängen. Ein Teil der CTBs behält während der gesamten Schwangerschaft einen undifferenzierten Phänotyp bei und bildet so ein Reservoir an plazentaren Stammzellen. Aus dem übrigen Teil der CTBs bilden sich im Wesentlichen zwei Subpopulationen an Trophoblastzellen: Synzytotrophoblastzellen (STBs) und invasive EVTs. Bisher ist wenig bekannt über das exakte Zusammenspiel und die Regulation der Zellzyklusregulatoren, die bestimmen, ob die Zytotrophoblastzellen weiter proliferieren oder einem Arrest oder Ausstieg aus dem Zellzyklus unterliegen, um die Differenzierung zu ermöglichen (Genbacev et al. 2000; Korgun et al. 2006). Der Pool der CTBs, die Marker der Zellzyklusphasen von G1 bis M, aber nicht die Inhibitoren der Cyclin-CDK Komplexe exprimieren und die Fähigkeit zur Proliferation beibehalten (auch als plazentare Stammzellen bezeichnet), ist in Plazenten des Ersttrimesters größer ($\geq 50\%$) als in Plazenten des Zweittrimesters ($\leq 25\%$) und nimmt zum Ende der Schwangerschaft (1 - 5 % der CTBs) weiter stark ab (Genbacev et al. 2000; Arnholdt et al. 1991). Cyclin D1 konnte in humanen Plazenten des Ersttrimesters in einem Großteil der Zellen des villösen Zytotrophoblast-Monolayers und in ca. 25 % der Zytotrophoblastzellen der Zellsäulen nachgewiesen werden (Genbacev et al. 2000). Cyclin D2 und Cyclin D3 spielen möglicherweise eine Rolle bei der Zellproliferation oder der Erhaltung der terminalen Differenzierung (Bartkova et al. 1998). Die CDK-Inhibitoren $p16^{INK4A}$, $p21^{Waf1/Cip1}$ und $p57^{Kip2}$ werden in allen Stadien der Schwangerschaft in einigen CTBs exprimiert. Der Prozentanteil dieser CTBs korreliert positiv mit dem Gestationsalter und könnte die Population der differenzierten CTBs darstellen (Genbacev et al. 2000). Auch die Differenzierung von murinen Trophoblaststammzellen in die nichtproliferativen Trophoblast-Riesenzellen geht mit der Expression der CDK-Inhibitoren $p21^{Waf1/Cip1}$ und $p57^{Kip2}$ einher, von denen $p57^{Kip2}$ essentiell ist für das Umschalten vom mitotischen Zellzyklus in die Endozyklen (Ullah et al. 2009; Ullah et al. 2011). Die CTBs in der proliferativen proximalen Region der Zellsäule exprimieren

Marker des Überganges von der G1- zur M-Phase des Zellzyklus (Genbacev et al. 2000). In der distalen Region der Zellsäule, die durch direkten Kontakt mit der Dezidua gekennzeichnet ist und der Ort der Differenzierung in den invasiven Phänotyp der EVT's ist, exprimieren die CTBs Marker der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus. Invasive EVT's exprimieren nur Marker, die mit einem Übergang von der G2- zur M-Phase korrelieren (Genbacev et al. 2000). Die Anzahl der in der M-Phase befindlichen Zellen steigt von der proximalen zur distalen Region der Zellsäule zunehmend an und erreicht ein Maximum in der Oberfläche der Dezidua (Genbacev et al. 2000).

1.1.7 Signaltransduktionswege der Trophoblastinvasion und Proliferation

Für die Proliferation, Migration und Invasion des Trophoblasten in die Dezidua sind Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden eine notwendige Voraussetzung, die wichtigsten werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

1.1.7.1 Der Notch-Rezeptor und -Signalweg

Der Notch-Signalweg spielt durch die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Funktion vieler Gewebe (Bianchi et al. 2006; Miele 2006). In Säugetieren kommen vier Notch-Rezeptoren (Notch1, Notch2, Notch3 und Notch4) sowie fünf Notch-Liganden vor (DLL1, DLL3, DLL4, Jag1 und Jag2) (Kopan und Ilagan 2009). Notch-Rezeptoren sind große Transmembranrezeptoren, die aus einer extrazellulären Domäne (engl.: *notch extracellular domain*; NECD), einer Transmembrandomäne (TM) und einer intrazellulären Domäne (engl.: *notch intracellular domain*; NICD) bestehen (Wharton et al. 1985). Die intrazelluläre Domäne NICD besteht aus verschiedenen funktionalen Domänen und unterliegt einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Hydroxylierung und Acetylierung (Zhao und Lin 2012). Die aktivierte NICD bindet durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor RBPjk (engl.: *recombination signal-binding protein 1 for J-kappa*; RBPjk) an den Promotor der Notch-Zielgene (Dong et al. 2010). Der Notch-Signalweg spielt im Embryo eine essentielle Rolle in der Kontrolle vieler zellulärer Prozesse, wie der Neurogenese (Lewis 1998) oder der Gefäßbildung (Roca und Adams 2007; Jakobsson et al. 2009). Bei Mäusen mit einer Defizienz von Notch1, Notch2, Jag1, DLL4,

RBPjk oder der Notch-Zielgene Hey1, Hey2 und Mash2 kommt es dadurch in der Mitte der Gestation zum Absterben der Embryonen (Guillemot et al. 1995; Xue et al. 1999; Krebs et al. 2000; Fischer et al. 2004; Gale et al. 2004; Roca und Adams 2007; Swift und Weinstein 2009). Ein weiteres Zielgen des Notch1-Rezeptors ist p21^{Waf1/Cip1}. Auch in der Entwicklung der humanen Plazenta spielt der Notch-Signalweg eine wichtige Rolle. Eine Expression der Rezeptoren Notch1, Notch2, Notch 3, Notch4 sowie ihrer Liganden Jag1, Jag2, DLL1 und DLL4 tritt in der frühen und späten Plazenta auf (Ji et al. 2012). Die Endothelzellen der villösen Kapillaren exprimieren Notch1, DLL4, Jag1 und DLL1, während STBs und CTBs Notch1, Notch3 und DLL1 exprimieren (De Falco et al. 2007; Herr et al. 2011). Notch1 wird dabei in CTBs exprimiert, während Notch2 vorrangig in den Zellsäulen und EVT's exprimiert wird, Notch3 tritt in allen Differenzierungsstadien der CTBs auf und Notch4 vorrangig in den CTB Vorläufern und den Zellsäulen (Hunkapiller et al. 2011). Anhand von *in vitro* Modellen konnte gezeigt werden, dass sich das Expressionsmuster von Notch-Rezeptoren und -Liganden während der Differenzierung und Invasion der Trophoblastzellen stark verändert (Hunkapiller et al. 2011). Der Notch-Signalweg könnte auch eine Rolle in der vaskulären Invasion der EVT's spielen, da eine konditionelle Gendeletion von Notch2 in Mäusen zu einer verminderten arteriellen Invasion durch die Trophoblastzellen und einer verminderten plazentaren Perfusion führt (Gasperowicz und Otto 2008). Es wird angenommen, dass die Expression des Notch1-Rezeptors in der humanen Ersttrimester-Plazenten charakteristisch für die Vorläuferzellen der plazentaren Zellsäule und dass der kanonische Notch-Signalweg notwendig für die Erhaltung der Proliferationskapazität ist (Knöfler 2013).

1.1.7.2 Integrin-Rezeptoren

Integrine sind bidirektionale Transmembran-Rezeptoren, die der Signalübermittlung für die Regulation diverser zellulärer Funktionen wie Proliferation, Zellüberleben, Differenzierung und Motilität dienen (Hynes 2002). Integrine sind heterodimere Glykoproteine, die sich aus verschiedenen α - und β -Untereinheiten zusammensetzen. Bisher sind 18 α - und acht β -Untereinheiten bekannt, die durch Kombinationen 24 verschiedene Integrine mit unterschiedlicher Ligandenspezifität bilden (Hynes 2002; Barczyk et al. 2010). Jede Untereinheit besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, die direkt mit ECM-Proteinen interagiert und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, die zytoskelettale Adapterproteine und intrazelluläre Signalmoleküle rekrutiert. Die Bidirektionalität der Signaltransduktion zeichnet

sich auf der einen Seite darin aus, dass die Assoziierung des zytoplasmatischen Schwanzes mit intrazellulären Adapterproteinen die extrazelluläre Ligandenbindung kontrolliert und auf der anderen Seite die extrazelluläre Ligandenbindung zur Clusterbildung und Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führt (Hynes 2002; DuFort et al. 2011). Die Integrin-abhängige Adhäsion induziert die Phosphorylierung und Aktivierung von zahlreichen Signalmediatoren wie FAK, Src, ILK p130CAS, PI3K, JNK und MAPK und reguliert die GTPasen der Rho-Familie, die eine wichtige Rolle in zentralen Prozessen der Zellmigration wie der Organisation des Aktinzytoskeletts, der Kontraktilität und der Veränderung der Zellform spielen (Hynes 2002; Streuli und Akhtar 2009; Barczyk et al. 2010; Cabodi et al. 2010). In der humanen Plazenta sind Integrine eng mit der Regulation der Trophoblastinvasion verbunden (Damsky et al. 1994). So ändert sich im Verlauf der invasiven Differenzierung der Trophoblastzellen das Expressionsmuster der verschiedenen Integrine (Damsky und Werb 1992; Aplin 1993; Damsky et al. 1994). In der humanen Plazenta des ersten Schwangerschaftstrimesters ist beispielsweise die Expression des Integrins $\alpha 6$ auf die CTB-Stammzellen beschränkt, während die Integrine $\alpha 5 \beta 1$ und $\alpha 1 \beta 1$ in den differenzierenden und invasiven EVT's stark exprimiert werden (Damsky et al. 1994). Eine Blockierung des Integrins $\alpha 5 \beta 1$ durch spezifische Antikörper inhibierte die Invasion der CTBs (Damsky et al. 1994; Irving und Lala 1995; Gleeson et al. 2001). EVT's späterer Gestationsstadien, die sich durch eine stark vermindert invasive Invasionskapazität auszeichnen und auch keine Hochregulierung des Integrins $\alpha 1 \beta 1$ mehr aufweisen, weisen darauf hin, dass auch dieses Integrin eine kritische Rolle in der Trophoblastinvasion spielen könnte (Damsky et al. 1994). Es liegt daher nahe, dass das zeitlich und räumlich regulierte Muster der Integrin-Expression eine zentrale Rolle in der Regulation der invasiven Differenzierung des Trophoblasten spielt (Damsky et al. 1994).

1.1.7.3 Die Fokale Adhäsionskinase (FAK)

Die Fokale Adhäsionskinase (FAK) kommt in fokalen Adhäsionen, Proteinkomplexen, die durch Ansammlung (engl.: *clustering*) von Integrinen gekennzeichnet sind, vor und übermittelt an den Kontaktstellen zwischen migrierenden Zellen und der umgebenden extrazellulären Matrix (engl.: *extracellular matrix*; ECM) Adhäsions- und Wachstumsfaktoren-abhängige Signale in die Zellen. Die Phosphorylierung und Aktivierung von FAK erfolgt durch Aktivierung von GPCRs durch Integrine oder andere Wachstumsfaktor-Rezeptoren in fokalen Adhäsionen (Pollheimer und Knöfler 2005). Die Phosphorylierung und Aktivierung von FAK

ist ein zentraler Prozess der Zellmigration, der besonders an der Zellfront migrierender Zellen auftritt (Wang et al. 2001). Auch in der Trophoblastmigration und –invasion spielt die Integrin-vermittelte Signalübermittlung und Aktivierung von FAK eine wichtige Rolle. Die Trophoblastdifferenzierung ist durch ein sich spezifisch veränderndes Expressionsmuster der verschiedenen Integrin-Heterodimere gekennzeichnet, das die Trophoblastinvasion reguliert (Damsky et al. 1994; Aplin et al. 1999). In invasiven Trophoblasten wurde die gleichzeitige Expression von MMP-2, Integrinen und aktivem, phosphorylierten FAK nachgewiesen (Ilic et al. 2001; MacPhee et al. 2001) und in villösen Explantkulturen oder Zytotrophoblasten reduziert die Herunterregulierung der FAK-Expression *in vitro* die Migration und Invasion (Ilic et al. 2001; MacPhee et al. 2001). Proteine wie der Aminosäuretransporter CD98 kolokalisieren in EVTs mit dem Integrin $\alpha\beta 3$ und fördern die Migration durch Aktivierung von FAK (Kabir-Salmani et al. 2008). Verschiedene Wachstumsfaktoren wie IGFBP-1 und IGF-1 aktivieren FAK in Trophoblastzellen. Z.B. weisen mit IGFBP-1 behandelte HTR-8/SVneo Zellen eine verstärkte Phosphorylierung von FAK auf (Gleeson et al. 2001). Eine Behandlung von EVTs mit IGF-1 induziert die Aktivierung von FAK und die Stressfaserbildung (Kabir-Salmani et al. 2002).

1.1.7.4 Der Phosphoinositid-3-kinase (PI3K)/ Akt - Signalweg

Der PI3K/ Akt - Signalweg ist an der Regulation vieler zellulärer Prozesse, wie Zellwachstum, Proliferation, Migration und Zellüberleben beteiligt (Manning und Cantley 2007). Durch Aktivierung von RTKs (Johnson et al. 1995) oder GPCRs (Schluter et al. 1998) oder Integrinen (King et al. 1997) kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von PI3K an der Membran. PI3K phosphoryliert und konvertiert dann PIP2 zu PIP3. Erhöhte PIP3 - Level wiederum resultieren in der Rekrutierung und Aktivierung von Akt und der Phosphorylierung von weiteren, in der Signalkaskade nachgeschalteten Faktoren, wie z.B. der Kinase mTOR (engl.: *mammalian target of rapamycin*; mTOR). mTOR kontrolliert das Durchlaufen des Zellzyklus und die Zellgröße/ -masse durch Phosphorylierung von Proteinen, die die Translation regulieren. Akt phosphoryliert eine Vielzahl an Zielproteinen, die die Proliferation, das Zellwachstum und Überleben der Zelle kontrollieren. Erhöhte PIP3 Level durch Hyperaktivierung der PI3K oder Funktionsverlustmutationen in der Phosphatase PTEN (engl.: *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*; PTEN), die PIP3 zu PIP2 konvertiert, treten z.B. in Krebsarten auf (Knöfler 2010). Im humanen Trophoblasten wurde

eine Aktivierung des PI3K/ Akt - Signalweges durch anti-apoptotische Faktoren wie EGF beschrieben (Johnstone et al. 2005) und auch an der Differenzierung muriner Trophoblast-Riesenzellen wurde eine Beteiligung des PI3K/ Akt – Signalweges nachgewiesen (Kamei et al. 2002). Weniger ist über die Rolle von Akt in der Migration bekannt, die Akt-Isoformen Akt1 - 3 können die Motilität abhängig vom Zelltyp negativ oder positiv beeinflussen (Manning und Cantley 2007). So aktivieren z.B. EGF und IGF-II den PI3K/ Akt - Signalweg und die Akt-abhängigen Migration von HTR-8/SVneo Trophoblastzellen (Qiu et al. 2004; Qiu et al. 2005). HGF verstärkt abhängig von der PI3K-Aktivierung die Migration von SGHPL-5 Trophoblastzellen (Cartwright et al. 2002). Außerdem wurde eine hCG- und EGF-abhängige Aktivierung des PI3K/ Akt – Signalweges und Expression von MMP-2 und MMP-9 in SGHPL-5 Zellen und villösen Explantkulturen beschrieben (Qiu et al. 2004; Prast et al. 2008).

1.1.7.5 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs)

MAPKs sind Serin-/ Threonin-spezifische Proteinkinasen, zu deren Familie eine große Gruppe von Enzymen gehört, die sequentiell durch Phosphorylierung aktiviert werden. Durch Ligandenbindung an RTKs (Porter und Vaillancourt 1998), GPCRs (Short et al. 2000) oder Integrine (Schlaepfer et al. 1994) werden Enzyme der MAPK Kinase Kinase Familie wie Ras, durch Raf aktiviert. Dies führt zu einer Aktivierung der MAPK Kinasen, z.B. den MEKs, die nachfolgend vier verschiedene Familien von MAPKs phosphorylieren, z.B. ERK (engl.: *extracellular-signal regulated kinase*; ERK), c-Jun N-terminale Kinasen (engl.: *c-Jun N-terminal kinases*; JNKs) und verschiedene p38 MAPKs. Während ERKs hauptsächlich durch mitogene Signale aktiviert werden, werden JNK und p38 MAPK hauptsächlich mit Stress und inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht (Kyriakis und Avruch 2001). In der humanen Plazenta konnte durch verschiedene EVT-Modelle eine Aktivierung der ERKs durch Wachstumsfaktoren in Zusammenhang mit der Trophoblastmotilität gebracht werden (Knöfler 2010). So aktivieren IGF-II und IGFBP-1 in HTR-8/SVneo Zellen ERK1/2 und fördern die Migration (Gleeson et al. 2001; McKinnon et al. 2001) und HGF die MEK (engl.: *MAP kinase or ERK kinase*; MEK)-abhängige Motilität von SGHPL-4 Zellen (Cartwright et al. 2002). Auch das Schwangerschaftshormon hCG fördert die Trophoblastmigration durch eine MEK-abhängige Phosphorylierung von ERK in SGHPL-5 Zellen und villösen Explantkulturen (Prast et al. 2008). Endothelin, EGF und Prostaglandin E2 stimulieren die Phosphorylierung von ERKs und die Migration von HTR-8/SVneo Trophoblastzellen (Chakraborty et al. 2003; Qiu

et al. 2004; Nicola et al. 2008). Auch eine ERK-abhängige Induktion von MMP-2 und MMP-9 durch hCG- und EGF konnte in Trophoblastzellen nachgewiesen werden (Qiu et al. 2004; Prast et al. 2008), was ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle des MAPK-Signalweges in der Regulation der Trophoblastmigration und –invasion darstellt.

1.2 Die CCN Protein-Familie

Zur Familie der matricellulären CCN-Proteine gehören sechs Mitglieder. Benannt wurde die Familie nach den drei zuerst beschriebenen Proteinen CYR61 (engl.: *cysteine-rich, angiogenic inducer, 61*; CYR61/ CCN1) (O'Brien et al. 1990), CTGF (engl.: *connective tissue growth factor*; CTGF/ CCN2) (Bradham et al. 1991) und NOV (engl.: *nephroblastoma overexpressed*; NOV/ CCN3) (Joliot et al. 1992). Ebenfalls zur Familie der CCN-Proteine gehören die WISP-Proteine 1-3 (engl.: *Wnt-induced secreted protein 1-3*; WISP1-3/ CCN4-6) (Pennica et al. 1998). Die Struktur der Mitglieder besteht aus vier konservierten Modulen und einem N-terminalen Sekretionspeptid (siehe **Abb. 7**). Die vier Module bestehen aus einer IGFBP-ähnlichen Domäne (IGFBP/ Modul I), einer Von-Willebrand-Faktor-ähnlichen Domäne (VWC/ Modul II), einer Thrombospondin-ähnlichen Domäne (TSP-1/ Modul III) und einer Cystein-reichen C-terminalen Domäne (CT/Modul IV), die bei CCN5 fehlt. Die Domänen sind durch Hinge-Regionen verbunden, die Angriffspunkte für die proteolytische Spaltung bieten (Leask und Abraham 2006). CCN Proteine sind sezernierte mit der ECM assoziierte Proteine, deren Hauptaufgaben in der Modulation von Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakten liegen. Weiterhin modulieren sie fokale Adhäsionen und kontrollieren das Zellattachement und die Migration. Ihre Signalweiterleitung erfolgt durch Integrine und Proteoglykane und sie werden durch eine Vielzahl an verschiedenen Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β induziert. CCN Proteine regulieren wichtige zellbiologische Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Adhäsion, Migration, Apoptose, Bildung der extrazellulären Matrix und Angiogenese (Leask und Abraham 2006).

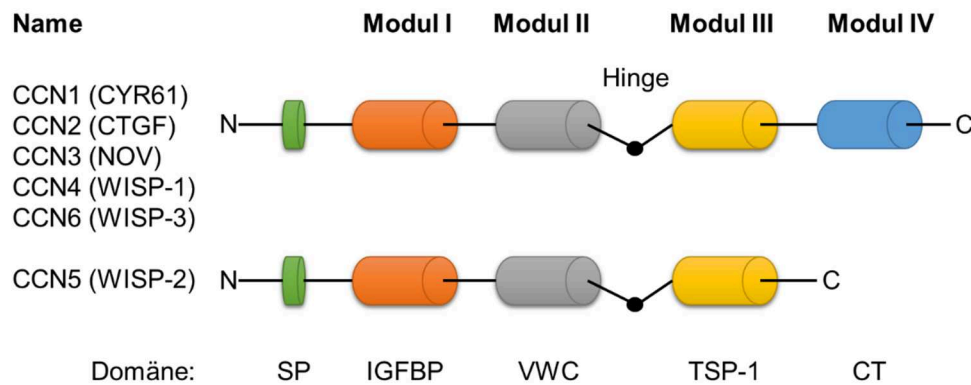


Abb. 7: Modulare Struktur der CCN Proteinfamilie.

Die Struktur der Proteine CCN1 (CYR61), CCN2 (CTGF), CCN3 (NOV), CCN4 (WISP-1), CCN5 (WISP-2) und CCN6 (WISP-3) besteht aus vier konservierten Modulen und einem N-terminalen Sekretionspeptid (SP). Die vier Module bestehen aus einer IGFBP-ähnlichen Domäne (IGFBP/ Modul I), einer Von-Willebrand-Faktor-ähnlichen Domäne (VWC/ Modul II), einer Thrombospondin-ähnlichen Domäne (TSP-1/ Modul III) und einer Cystein-reichen C-terminalen Domäne (CT/ Modul IV), die bei CCN5 fehlt. Die Domänen sind durch Hinge-Regionen verbunden, die Angriffspunkte für die proteolytische Spaltung bieten (verändert nach: Leask und Abraham 2006).

1.2.1 CCN1 (cysteine-rich, angiogenic inducer 61; CYR61)

CCN1 weist wie die anderen matrizellulären CCN-Proteine diverse Funktionen in verschiedenen Zelltypen auf. CCN1 wurde zunächst als Serum-induzierbares unmittelbares frühes Genprodukt in murinen Fibroblasten identifiziert (O'Brien et al. 1990). Inzwischen ist aber eine Vielzahl an weiteren, z.T. auch widersprüchlichen, Funktionen bekannt. CCN1 kann z.B. nicht nur das Zellüberleben, sondern auch die Apoptose fördern. Es steigert die Zellproliferation, induziert aber auch einen Zellzyklusarrest. In manchen Zusammenhängen fördert CCN1 das Tumorwachstum, während es in anderem Kontext die Tumorgenese unterdrücken kann (Lau 2011). Diese grundverschiedenen Funktionen sind auf die Zelltyp- und Kontext-abhängige Interaktion mit verschiedenen Integrinen und Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) zurückzuführen (Lau und Lam 2005; Lau 2011). Obwohl CCN1 keine RGD-Sequenz, die Integrine binden kann, enthält (Hynes 2002), weist es spezifische nicht-kanonische Bindungsstellen für die Integrine α M β 2 (Schober et al. 2003), α 6 β 1 (Leu et al. 2003), α v β 3 (Chen et al. 2004) und den α 6 β 1-HSPG Korezeptor (Leu et al. 2004) auf. Neben Integrinen und HSPGs könnte CCN1 auch mit anderen Zelloberflächenrezeptoren interagieren (Lau 2011). Sezerniertes CCN1 ist nicht-kovalent mit der extrazellulären Matrix und der Zelloberfläche verbunden (Yang und Lau 1991), daher liegt nahe, dass CCN1 die Zelladhäsion unterstützt und adhäsives Signalwege in vielen adhärenen Zelltypen induziert (Lau und Lam

2005; Chen und Lau 2009). In humanen Hautfibroblasten vermittelt CCN1 beispielsweise die Zelladhäsion durch Integrin $\alpha 6\beta 1$ -HSPGs und resultiert in der Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen, der Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase, der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Bildung von Strukturen, die für die Zellmotilität wie Filopodien und Lamellipodien notwendig sind (Chen et al. 2001). Zudem kann CCN1 in Fibroblasten durch eine p53-abhängige Aktivierung von Bax und Cytochrom C die Apoptose induzieren (Todorovic et al. 2005). Eine weitere für Proteine der extrazellulären Matrix ungewöhnliche Funktion von CCN1 ist die Induktion der Seneszenz in Fibroblasten durch Bindung an Integrin $\alpha 6\beta 1$ und HSPGs der Zelloberfläche (Jun und Lau 2010; Kim et al. 2013; Leu et al. 2013). In der murinen Embryogenese spielt CCN1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung des skelettalen, kardiovaskulären und neuronalen Systems, der Knockout von CCN1 im murinen Modell führt durch einen spezifischen Defekt der Gefäßbifurkation an den chorioallantoiden Verbindungspunkten zu einer mangelnden Vaskularisierung der Plazenta und damit zum Absterben der Embryonen (O'Brien und Lau 1992; Mo et al. 2002; Mo und Lau 2006). Die spezifischen Glykosylierungsstellen für CCN1 sind bisher nicht bekannt. Das Auftreten einer unglykosylierten intrazellulär auftretenden Form von ca. 43 kDa und einer sezernierten glykosylierten Form von ca. 70 kDa wurde aber bereits beschrieben (Gashaw et al. 2008) und auch hier werden unterschiedliche Funktionen der beiden Formen angenommen (Yang und Lau 1991).

1.2.2 CCN3 (nephroblastoma overexpressed; NOV)

CCN3 wurde als erstes in durch Myeloblastose-assoziiertem Virus Typ-1 (engl.: *myeloblastosis-associated virus type 1*; MAV1) induzierten Nephroblastomen beschrieben (Joliot et al. 1992). Wie alle Mitglieder der CCN-Familie ist CCN3 ein Cystein-reiches sezerniertes Protein, das mit der extrazellulären Matrix assoziiert ist. CCN3 ist an einer großen Anzahl von verschiedenen zellbiologischen Prozessen beteiligt, wie der Proliferation, der Differenzierung, der Angiogenese sowie an pathophysiologischen Bedingungen wie Fibrose und Krebs (Perbal 2001; Brigstock 2003; Leask und Abraham 2006; Perbal 2006; Chen und Lau 2009; McCallum und Irvine 2009; Zuo et al. 2010; Kular et al. 2011; Ouellet und Siegel 2012). In Mäusen mit mutiertem CCN3 konnten skelettale und kardiale Anomalien wie Kardiomyopathien, Muskelatrophien und die Kataraktbildung festgestellt werden (Heath et al. 2008). In humanen endothelialen Zellen der Umbilikalvenen fördert CCN3 die Adhäsion durch

die Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, und HSPGs, während es die Migration durch die Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ reguliert (Lin et al. 2003). CCN3 kann durch hämatopoetische Vorläuferzellen in das humane Serum abgegeben werden, um dort einen Komplex mit Fibulin-1 zu bilden (Thibout et al. 2003). CCN3 ist ein wichtiges sezerniertes extrazelluläres Protein in Hinblick auf die mesenchymale Stammzelldifferenzierung und reguliert die Differenzierung, das Wachstum und die Reifung von osteogenen, chondrogenen und hematopoetischen Vorläuferzellen (Zuo et al. 2010). CCN3 fungiert dabei als positiver Mediator während es in der Muskel- und Osteoblast-Differenzierung inhibitorisch wirkt (Katsuki et al. 2008). CCN3 konnte die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen durch die Bindung an Notch1 regulieren. Es wurde gezeigt, dass CCN3 downstream gelegene Mitglieder des Notch-Signalweges wie Hes/ Hey und $p21^{Waf1/Cip1}$ hochreguliert und die osteogene Aktivität inhibiert (Katsuki et al. 2008). Im Ewing-Sarkom inhibiert CCN3 die Proliferation und verstärkt gleichzeitig die Migrations- und Invasionseigenschaften (Benini et al. 2005). Neben der spezifischen Bindung an verschiedene Integrine sind die verschiedenen Funktionen von CCN3 auch auf verschiedene Splice-Varianten und post-translationale Modifikationen zurückzuführen (Perbal 2009). Das humane CCN3 besteht aus 375 Aminosäuren mit einer vorhergesagten Größe von 44 kDa. Es besitzt zwei mögliche N-Glykosylierungsstellen an den Asparaginresten an Position 97 und an Position 280, woraus für das sezernierte CCN3-Protein ein Molekulargewicht von ca. 54 kDa resultiert (Chevalier et al. 1998). Es ist daher anzunehmen, dass die CCN3-Isoformen mit höherem Molekulargewicht aus der posttranslationalen Glykosylierung resultieren und die Isoformen mit geringerem Molekulargewicht aus alternativem Splicing oder proteolytischer Spaltung (Ouellet und Siegel 2012).

1.2.3 Die Rolle von CCN1 und CCN3 in der embryonalen Entwicklung und Plazentation

In der murinen Embryogenese steht CCN1 in engem Zusammenhang mit der Entwicklung des skelettalen, des kardiovaskulären und des neuronalen Systems (O'Brien und Lau 1992). In CCN1-Knockout Mäusen kommt es bereits *in utero* zum Absterben der Embryonen (Mo et al. 2002). Bei einem großen Anteil der Embryonen schlägt dabei bereits die Fusion der Allantois mit dem Chorion fehl, während die übrigen Embryonen in der Mitte der Gestation durch placentare, vaskuläre Insuffizienz, einer mangelnden embryonalen vaskulären Integrität, Hämorrhagie und einem schweren Atrioventrikulären Septumdefekt (AVSD) absterben (Mo et al. 2002; Mo und Lau 2006). Es werden spezifische angiogene Defekte beobachtet, so ist die

Gefäßbifurkation an den chorioallantoiden Verbindungspunkten beeinträchtigt und führt zu einem Mangel an Gefäßen, die sich in die Plazenta verzweigen (Mo et al. 2002). Zudem scheint CCN1 eine Rolle in der murinen Implantation und der Interaktion mit der Dezidua zu spielen, da es stark im ektoplazentaren Konus und in der Trophoblast-Riesenzellen exprimiert wird (O'Brien und Lau 1992). In der humanen Plazenta werden CCN1 und CCN3 in den nicht-proliferierenden interstitiellen Trophoblast-Riesenzellen, den vaskulären Endothelzellen und den mesenchymalen und stromalen Zellen der plazentaren Stammzotten exprimiert, dabei nimmt das Expressionslevel im Verlauf der Schwangerschaft zu (Gellhaus et al. 2006). In den Plazenten und Seren von präeklampsischen Schwangeren dagegen wurden signifikant verminderte Level an CCN1 und CCN3 gefunden (Gellhaus et al. 2006; Gellhaus et al. 2007). Wie in Kapitel 1.1.3 bereits beschrieben, ist die Präeklampsie eine Schwangerschaftserkrankung, die mit einer unzureichenden Invasion des extravillösen Trophoblasten in die Dezidua und einer unzureichenden Umwandlung der maternalen Spiralarterien einhergeht. Auch hier deutet sich also, ähnlich wie im murinen Modell für CCN1 beschrieben, eine Funktion für CCN1 und CCN3 in der plazentaren Angiogenese und der Umwandlung des dezidualen Gewebes an (Lau 2011). Zudem könnten die verminderten CCN1- und CCN3-Level in den Plazenten und Seren von Schwangeren mit einer Präeklampsie als Biomarker für die frühe Diagnose dieser Erkrankung dienen (Gellhaus et al. 2007). In plazentaren Explantkulturen konnte gezeigt werden, dass CCN1 und CCN3 in den extravillösen Trophoblastzellen exprimiert werden und dass ihr Expressionslevel in hypoxischer Umgebung hochreguliert ist (Wolf et al. 2010). In der Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 zeichnete sich unter Hypoxie eine Hochregulierung sowohl der intrazellulären als auch der sezernierten Form von CCN1 und CCN3 durch Stabilisierung von HIF-1 α (engl.: *hypoxia-inducible factor-1 α* ; HIF-1 α) ab (Wolf et al. 2010). Da die Präeklampsie sowohl durch eine Deregulation von CCN1 und CCN3 (Gellhaus et al. 2006; Gellhaus et al. 2007) als auch durch chronische Hypoxie begleitet wird (Zhou et al. 1998; McMaster et al. 2004) könnte hier ein direkter Zusammenhang bestehen. Eine weitere Studie gab erste Hinweise, dass auch der Glykosylierungsstatus von CCN3 in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnte; unabhängig von seinem Glykosylierungsstatus wirkte CCN3 proliferationshemmend auf Jeg3 Chorionkarzinomzellen wirkt, aber nur die unglykosylierte Form verstärkte deren Migrationsverhalten (Yang et al. 2011). CCN3 könnte ein Ungleichgewicht zwischen der Proliferation und Migration der humanen Trophoblastzellen bewirken und so zu der unzureichenden Trophoblastinvasion in die Dezidua und dem unzureichenden Umbau der Spiralarterien in präeklampsischen Plazenten beitragen (Wolf et al. 2010; Yang et al. 2011; Wagener et al. 2013). In einer kürzlich

publizierten Studie wurde gezeigt, dass in Jeg3 Zellen die verminderte Proliferation nach Behandlung mit beiden Glykosylierungsformen von rekombinantem CCN3 durch Aktivierung des Notch-Signalweges und dessen Zielgen $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ vermittelt wird, während die Migrations- und Invasionseigenschaften ausschließlich durch die unglykosylierte Form durch Interaktion mit dem Integrin $\alpha5\beta1$ und die Aktivierung des Akt- und des MAPK-Signalweges verstärkt wurden (Wagener et al. 2013).

1.3 Zielsetzung

Bei plazentaren Erkrankungen wie der Präeklampsie und IUGR vermutet man als Ursache eine Fehlregulation im Gleichgewicht zwischen Proliferation und Invasion des Trophoblasten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle der beiden CCN-Proteine CCN1 und CCN3 bei der Regulation des Gleichgewichtes zwischen Trophoblastproliferation und –invasion anhand der plazentaren Trophoblastzelllinie SGHPL-5 untersucht werden. Der Ausstieg der Trophoblastzellen aus dem Zellzyklus und die nachfolgende Differenzierung in den invasiven Phänotyp sind zentrale Prozesse der Plazentation, die von der exakten Koordination der Proliferations-, Differenzierungs- und Invasionseigenschaften der Trophoblastzellen abhängen. Der Fokus dieser Arbeit liegt hierbei auf den molekularen Regulationsmechanismen und Signalkaskaden, die durch CCN1 und CCN3 ausgelöst werden und den Vorgang, der die proliferativen CTBs der Zellsäule in den invasiven Phänotyp, der sich von der Zellsäule ablöst und tief in die Dezidua einwandert, kontrollieren. Frühere Arbeiten zeigen, dass CCN1 und CCN3 in der humanen Plazenta stark in den nicht-proliferierenden interstitiellen Trophoblast-Riesenzellen exprimiert werden (Gellhaus et al. 2006), in den Plazenten und Seren von präeklampsischen Schwangeren dagegen aber signifikant verringert waren (Gellhaus et al. 2006; Gellhaus et al. 2007). Weitere Studien anhand der Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 ließen vermuten, dass CCN3 ein Ungleichgewicht zwischen der Proliferation und Migration der humanen Trophoblastzellen bewirkt und so zu der unzureichenden Trophoblastinvasion in die Dezidua und dem unzureichenden Umbau der Spiralarterien in präeklampsischen Plazenten beiträgt (Yang et al. 2011; Wagener et al. 2013). Durch Behandlung mit sowohl der glykosylierten als auch der unglykosylierten Form von rekombinanten humanen CCN1 und CCN3 sollten zellbiologische Prozesse und deren molekulare Regulation, die in direktem Zusammenhang mit dem Proliferations- und Migrationsverhalten stehen anhand der

plazentaren Trophoblastzelllinie SGHPL-5 im Detail untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten im Einzelnen folgende Fragestellungen analysiert werden:

- Welchen Einfluss hat die Behandlung mit rekombinantem humanen CCN1 und CCN3 auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Trophoblastzelllinie SGHPL-5?
- Hat der Glykosylierungsstatus von CCN1 und CCN3 Einfluss auf deren Wirkung auf diese zellbiologischen Veränderungen?
- Durch welche Rezeptoren wird die CCN1- und CCN3-abhängige Regulation der Proliferations- und Migrationseigenschaften vermittelt?
- Welche Signalkaskaden werden durch CCN1 und CCN3 nach Aktivierung dieser Rezeptoren vermittelt?
- Wird die proliferationshemmende Wirkung von CCN3 durch Aktivierung des Notch1-Rezeptors und seines Zielgens p21^{Waf1/Cip1} vermittelt?
- Wird die migrationsfördernde Wirkung über das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ und Aktivierung von FAK und Akt vermittelt?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tab. 1: Verwendete primäre Antikörper.

Angegeben sind die eingesetzten Verdünnungen im Western Blot (WB) und in der Immunzytochemie (ICC).

<i>primärer Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
polyclonal goat anti-human CCN3	1:500 (WB)	R&D systems, #AF1640
	1:50 (ICC)	
polyclonal rabbit anti-human Actin	1:600 (WB)	Sigma, #A2066
monoclonal mouse anti-human CCN1	1:100 (ICC)	immunoGlobe GmbH über DRG-
	1:1000 (WB)	Diagnostics, Hybridoma Klon 8-8-6
mouse anti-human p21 ^{Waf1/Cip1}	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, #S2946
rabbit anti-human phospho-p53	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, #CS9284
rabbit anti-human Caspase-3	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, #CS9662
mouse anti-human GAPDH	1:4000 (WB)	HyTest, #5G4 Mab 6C5
rabbit anti-human cleaved Notch 1	1:500 (WB)	Cell Signaling Technology, #2421
rabbit anti-human FAK	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology, sc-557
rabbit anti-human phospho-FAK	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, #3283
rabbit anti-human p44/42 MAPK	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, #4695
rabbit anti-human phospho-p44/42 MAPK	1:2000 (WB)	Cell Signaling Technology, #4370
rabbit anti-human Akt	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, #9272
rabbit anti-human phospho-Akt	1:2000 (WB)	Cell Signaling Technology, #4060
rabbit anti-human p57 ^{Kip2}	1:500 (WB)	Thermo Scientific, PA5-16539

<i>primärer Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
mouse anti-human p27 ^{Kip1}	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, #3698
rabbit anti-human phosho-Rb	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, #8516
mouse anti-human cyclin D1	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology, sc-8396
rabbit anti-human Integrin alpha5	1:2000 (WB)	Chemicon International, AB1928
mouse anti-human Integrin-β1	1:50 (ICC)	Chemicon International, MAB2079Z
mouse anti-human p16 (F-9)	1:100 (WB)	Santa Cruz Biotechnology, sc-55600

Tab. 2: Verwendete sekundäre Antikörper.

Angegeben sind die eingesetzten Verdünnungen im Western Blot (WB) und in der Immunzytochemie (ICC).

<i>Sekundärer Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
HRP Esel Anti-Ziege IgG,	1:10000 (WB)	Santa Cruz
HRP Ziege Anti-Maus IgG,	1:10000 (WB)	Santa Cruz
HRP Ziege Anti-Kaninchen IgG,	1:10000 (WB)	Santa Cruz
Alexa Fluor® 488 Ziege Anti-Maus IgG1	1:100 (ICC)	Invitrogen, A-11001
Alexa Fluor® 488 Esel Anti-Ziege IgG ₁	1:100 (ICC)	Invitrogen, A-11055
Cy3® Ziege Anti-Maus IgG	1:100 (ICC)	Invitrogen, A-10521
Cy3® Ziege Anti-Kaninchen IgG	1:100 (ICC)	Invitrogen, A-10520
Cy3® Ziege Anti-Ratte IgG	1:100 (ICC)	Invitrogen, A-10522

2.1.2 Oligonukleotide

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide.

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die Annealing-Temperatur liegt, wenn nicht in der Tabelle anders angegeben bei 60°C.

<i>Primer Sets</i>	<i>Sequenz</i>	<i>PCR Produkt (bp)</i>	<i>GenBank accession number</i>
β-Aktin			
sense	5'-ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAA A-3'	213	NM_001101
anti-sense	5'-TAC GGC CAG AGG CGT ACA GGG ATA G-3'		
huCK-7			
sense	5'-CAG GAT GTG GTG GAG GAC TT-3'	178	NM_005556.3
anti-sense	5'-TGA GGG TCC TGA GGA AGT TG-3'		
huITGA5			
sense	5'-CTA CAA TGA TGT GGC CAT CG-3'	198	NM_002205
anti-sense	5'-GGA TAT CCA TTG CCA TCC AG-3'		
huITGB1	62°C		
sense	5'- TGG CCT TGC ATT ACT GCT GA -3'	104	NM_002211.3 NM_033668.2
anti-sense	5'- GCG TGT CCC ATT TGG CAT TC -3'		NM_133376.2
huMMP-2			
sense	5'-ATG ACA GCT GCA CCA CTG AG-3'	174	NM_004530.2
anti-sense	5'-ATT TGT TGC CCA GGA AAG TG-3'		
huMMP-9			
sense	5'-TTG ACA GCG ACA AGA AGT GG-3'	179	NM_004994.2
anti-sense	5'-GCC ATT CAC GTC GTC CTT AT-3'		
huCx40			

<i>Primer Sets</i>	<i>Sequenz</i>	<i>PCR Produkt (bp)</i>	<i>GenBank accession number</i>
sense	5'-TAG GCA AGG TCT GGC TCA CT-3'	186	NM_181703.2
anti-sense	5'-TGA TCT GCA GCA CCC AGT AG-3'		
huCx43			
sense	5'-TGG ATT CAG CTT GAG TGC TG-3'	145	NM_000165.3
anti-sense	5'-GAT ATT CAA GGC CAG GGA CA-3'		
huTGF-β3			
sense	5'-GGA ATG AGC AGA GGA TCG AG-3'	218	NM_003239.2
anti-sense	5'-ATT GGG CTG AAA GGT GTG AC-3'		
huCCN3			
sense	5'-CAC GGC GGT AGA GGG AGA TA-3'	251	NM_002514.3
anti-sense	5'-GGG TAA GGC CTC CCA GTG AA-3'		
huCCN1			
sense	5'-TAA GGA GCT GGG ATT CGA TG-3'	142	NM_001554
anti-sense	5'-TCT GGC CTT GTA AAG GGT TG-3'		
huIGFBP-1			
sense	5'-CTA TGA TGG CTC GAA GGC TC-3'	156	NM_000596.2
anti-sense	5'-TTC TTG TTG CAG TTT GGC AG-3'		
huNotch-1			
sense	5'-TCC ACC AGT TTG AAT GGT CA-3'	193	NM_017617.3
anti-sense	5'-AGC TCA TCA TCT GGG ACA GG-3'		
huP21			
sense	5'-GCG ATG GAA CTT CGA CTT TG-3'	199	NM_001220778.1 NM_000389.4

<i>Primer Sets</i>	<i>Sequenz</i>	<i>PCR Produkt (bp)</i>	<i>GenBank accession number</i>
anti-sense	5'-CAG GTC CAC ATG GTC TTC CT-3'	120	NM_001220777.1 NM_078467.2
huP16	62°C		
sense	5'-CAT GGA GCC TTC GGC TGA C-3'		NM_001195132.1 NM_058197.4
anti-sense	5'-GGC CTC CGA CCG TAA CTA TT-3'		NM_000077.4
huP27			
sense	5'- CAG CTT GCC CGA GTT CTA CT -3'	236	NM_004064.3
anti-sense	5'- AAG AAT CGT CGG TTG CAG GT -3'		
huP57	63°C		
sense	5'-CTC CGC AGC ACA TCC ACG AT-3'	181	NM_000076.2 NM_001122631.1
anti-sense	5'-GGA AGT CGT AAT CCC AGC GG-3'		NM_001122630.1

2.1.3 Enzyme

Tab. 4: Verwendete Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Hersteller</i>
EcoRI	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Polymerase (5 U/ µl)	Biotherm, GeneCraft (Köln)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNase I (1 U/ µl)	Invitrogen (Karlsruhe)
M-MLV-RT (200 U/ µl)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

2.1.5 Größenstandards

Tab. 5: Verwendete Größenstandards

<i>Größenstandard</i>	<i>Hersteller</i>
1 kb DNA Ladder	GeneCraft, #GC-015-003-100
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, #26617
100 bp DNA Ladder	GeneCraft, #GC-015-004

2.1.6 Rekombinante Proteine

Tab. 6: Verwendete rekombinante Proteine

<i>Protein</i>	<i>Hersteller</i>
glykosyliertes rekombinantes humanes CCN3	R&D Systems, #1640-NV
unglykosyliertes rekombinantes humanes CCN3	PeproTech, #120-26
glykosyliertes rekombinantes humanes CCN1	R&D Systems, #4055-CR
unglykosyliertes rekombinantes humanes CCN1	PeproTech, #120-25

2.1.7 Reaktionskits

Tab. 7: Verwendete Reaktionskits

<i>Reaktionskit</i>	<i>Hersteller</i>
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche
E.Z.N.A Total RNA Kit	Omega Biotek (Nordcross, GA, USA)
E.Z.N.A Gel Elution Kit	Omega Biotek (Nordcross, GA, USA)
FITC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen™

2.1.8 Geräte

Tab. 8: Verwendete Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Brutschrank US Autoflow	NuAire (Plymouth, MN, USA)
Geldokumentationssystem Herolab SU-1	Herolab Laborgeräte (Wiesloch)
Gelelektrophoresekammer	Selbstbau Medizintechnik Universitätsklinikum Essen (Essen)
Konfokales Laserscanning-Mikroskop (Leica TCS SP5)	Leica (Wetzlar)
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen)
Lichtmikroskop Labovert FS	Zeiss (Oberkochen)
PCR-Maschine T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen)
pH-Meter HI 9025	Hanna Instruments (Kehl am Rhein)
Photometer BioPhotometer plus	Eppendorf (Hamburg)
Real-time PCR-Maschine ABI Prism 7300	Applied Biosystems (Weiterstadt)
SDS PAGE Elektrophoresekammer	Bio-Rad (München)
Spannungsquelle PHERO-stab. 500	Biotec-Fischer (Reiskirchen)
Sterilbank Class II	NuAire (Plymouth, MN, USA)
Western Blot Elektrophoresekammer	Bio-Rad (München)
Zellzählgerät Casy® Cell Counter	Schärfe System (Reutlingen)
Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge: Hettich Rotina 38R	Andreas Hettich (Tuttlingen)

2.1.9 Feinchemikalien

Tab. 9: Verwendete Feinchemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose, UltraPure	Invitrogen (Karlsruhe)
APS	Merck (Darmstadt)
BLOCK-iT Fluorescent Oligo	Invitrogen (Karlsruhe)
Borsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA	Carl Roth (Karlsruhe)
DAPI	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DEPC	Carl Roth (Karlsruhe)
D(+)-Glucose Monohydrat	Serva (Heidelberg)
Dinatriumsalz	Merck (Darmstadt)
DMEM/ F12, Phenolrot-frei	Invitrogen (Karlsruhe)
DMSO	Merck (Darmstadt)
dNTP-Mix (je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	GeneCraft (Köln)
DTT (0,1 M)	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA >99 %	Serva (Heidelberg)
Ethidiumbromidlösung 1 %; 10 mg/ml	Serva (Heidelberg)
Ethanol absolut	Riedel-de Haën (Seelze)
Essigsäure 100 %	Carl Roth (Karlsruhe)
FCS	Biochrom (Berlin)
Glycerin	Riedel-de Haën (Seelze)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
HPLC-H ₂ O	Merck (Darmstadt)
Hybond-C Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences (Freiburg)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Luminol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methanol pro analysis	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Milchpulver fettfrei	TSI (Zeven)
Mowiol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumfluorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Nitrozellulosemembran Hybond™-C Extra	GE Healthcare (München)
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Oligo(dT)18 Primer (0,5 µg/µl)	Invitrogen (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PBS	Biochrom (Berlin)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (Weiterstadt)
2-Propanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Proteasehemmer Inhibitor Complete EDTA-free	Roche Diagnostics (Mannheim)
Rotiquant Protein Assay	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese NF-Acrylamid/ Bis-Lösung 40 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 37 %	Carl Roth (Karlsruhe)
siCONTROL Non-Targeting siRNA #2	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)
5x siRNA Puffer	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)
SDS ultra pure >99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt)
Whatman-Papier, 3 mm	Biometra (Göttingen)
X-Ray Filme Super RX	Fuji Medical (Düsseldorf)
Zellkulturflaschen, -platten	Falcon (Heidelberg)

2.1.10 Software und Server

Tab. 10: Verwendete Software und Server

<i>Software</i>	<i>Server</i>
ABI Prism 7300	Applied Biosystems (Weiterstadt)
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software (San Diego, California, USA)

<i>Software</i>	<i>Server</i>
PASW Statistics 18	SPSS Inc. (Chicago, IL, USA)
TINA 2.09g	Raytest (Straubenhardt)
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
ExPASy Molecular Biology Server	http://www.expasy.ch/tools
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
WinMDI Software	Joe Trotter, The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility
CellQuest™ Software	Becton Dickinson, Heidelberg
Primer-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97 % inkubiert. Alle Materialien und Geräte wurden vor dem Einsatz in der Zellkultur desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert. Die Sterilbank wurde regelmäßig vor und nach Durchführung der Arbeiten mit UV-Licht bestrahlt. Lösungen wurden steril filtriert. In der Routinekultur wurden die Zellen alle drei Tage mit frischem Medium versorgt und bei ca. 70 % Konfluenz passagiert, um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten.

<i>Kulturmedium</i>	<i>Zusammensetzung</i>
SGHPL-5	Ham's F10 2 mM L-Glutamin 10 % (v/v) FCS
HEK 293T	MEM 10 % (v/v) FCS

2.2.2 Subkultivierung/ Passagieren von Zellen

Um ein Absterben der kultivierten Zellen nach Konfluenz zu verhindern, ist es notwendig, die Zellen durch „Passagieren“ zu verdünnen. Die Zellen werden durch einen enzymatischen Verdau aus dem Monolayer herausgelöst, in Suspension gebracht und nach entsprechender Verdünnung in ein neues Kulturgefäß überführt. Die Anzahl der Subkultivierungen und damit die Passagezahl einer Kultur erhöht sich dabei um 1. Zum Passagieren der Zellen wird das Kulturmedium entnommen und mit 37 °C warmer Waschlösung gewaschen, um Reste des Serums sowie divalente Kationen auszuwaschen. Die Zellen werden dann mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm aus Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt, bei 37 °C 3 – 10 min inkubiert, durch leichtes Klopfen aus dem Monolayer herausgelöst und in Suspension gebracht.

<i>Waschlösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Moscona (pH 7,4)	140 mM NaCl; 9 mM D(+)Glukose Monophosphat; 12 mM Natriumhydrogenphosphat; 4 mM KCl; 0,4 mM Natriumdihydrogenphosphat; 0,2 mM Kaliumdihydrogenphosphat

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA in Suspension gebracht. 50 µl der Zellsuspension wurden für die Bestimmung der Zellzahl entnommen und in ein Reaktionsgefäß mit 10 ml isotonischer Messlösung (CASYton) gegeben. Die Zellzahl wurde mit einem elektronischen Zellzählgerät (Casy® Cell Counter, Schärfe Systems, Reutlingen, Germany) bestimmt.

<i>Messlösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
CASYton	136 mM NaCl; 1 mM Dinatriumsalz; 5,4 mM KCl; 1,6 mM Natriumdihydrogenphosphat; 3,7 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 7,1 mM Natriumfluorid

2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden nur in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Zellen verwendet. Dafür wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben in Suspension gebracht und für 3 min bei 800 × g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,8 ml frischem Kulturmedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und nach Zugabe von 90 µl DMSO zunächst in Stickstoffdampf eingefroren. Zur längeren Lagerung wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.5 Behandlung der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 mit rekombinanten Proteinen

Für die einzelnen Versuchsanordnungen wurde die Zellen wie in den folgenden Unterpunkten beschrieben ausgesät und zum Adhärenz 24 h lang in normalem Kulturmedium inkubiert. Eine Synchronisierung der Zellzyklusphasenverteilung in der Kultur wurde durch Serumentzug für

weitere 24 h erreicht. Die Zellen wurden mit 1 µg/ml rekombinantem humanen glykosylierten CCN1 und CCN3 (g-rhCCN1, g-rhCCN3) aus Mausmyelomzellen (R&D Systems, Minneapolis, USA), nichtglykosyliertem CCN1 und CCN3 (ng-rhCCN1, ng-rhCCN3) aus *E. coli* (PeproTech, Hamburg, Germany) oder 0,1 % BSA in PBS als Lösungsmittelkontrolle behandelt.

2.2.6 Inhibierung des Notch-1 Signalweges in der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 mit dem γ -Sekretaseinhibitor DAPT

Zur Inhibierung des Notch-1 Signalweges wurden die Zellen für 48 h mit 100 µM γ -Sekretaseinhibitor DAPT (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) behandelt. Glykosyliertes rekombinantes CCN1 oder CCN3 Protein (1 µg/ml) wurde während der letzten 8 h der Behandlung zugegeben. Mithilfe unterschiedlicher Konzentrationen (50 - 100 µM) und Inkubationszeiten (8 - 48 h) des Inhibitors wurde die Funktionalität und Toxizität des Inhibitors getestet.

2.2.7 Inhibierung des Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Signalweges in der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 mit Integrin $\alpha 5$ siRNA

Für die Inhibierung des Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Signalweges wurde die Expression des Integrin $\alpha 5 \beta 1$ mit siRNA Oligonukleotiden gegen Integrin $\alpha 5$ herunterreguliert. Die siRNAs „integrin $\alpha 5$ SMARTpool“ und „siCONTROL non-targeting siRNA pool“ wurden von Dharmacon Research, Inc. (Lafayette, CO, USA) bezogen. Um die Expression des Integrins $\alpha 5$ in SGHPL-5 Zellen zu reduzieren, wurden die Zellen für 48 h mit 150 nM siRNA und 3 µl/ml FuGENE HD Transfektionsreagenz (Promega, Madison, USA) behandelt.

2.2.8 Herstellung eines Doxyzyklin-induzierbaren Überexpressionssystems für CCN3 in der Zelllinie SGHPL-5 (SGHPL-5/tetO-CCN3) durch lentivirale Gentransduktion

Das Tet-System bietet die Möglichkeit die rekombinante Überexpression eines Genes spezifisch durch Gabe von Tetrazyklin zu steuern (Gossen und Bujard 1992). Zu dem System gehören ein Regulator- und ein Antwortplasmid. Das Regulatorplasmid kodiert für den Tetrazyklin-abhängigen transkriptionellen Aktivator (engl.: *tetracycline-responsive transcriptional activator*; tTA), einem konstitutiv exprimierten Fusionsprotein aus dem Tet-

Repressor des Tn10-Transposons und der VP16-Aktivierungsdomäne des *Herpes simplex* Virus, das unter der Kontrolle eines CMV-Promotors steht. Das Antwort-Plasmid beinhaltet die cDNA des zu exprimierenden Gens, deren Expression unter der Kontrolle des Tet-Repressors (engl.: *tet responsive element*; TRE) steht. Beide Plasmide können mit den üblichen Methoden stabil in Zellen transfiziert werden. Man unterscheidet zwei Arten des Systems. Das Tet-Off-System ist in Abwesenheit von Tetrazyklin aktiv, da tTA an TRE bindet und die Transkription des Zielgens aktiviert. In Anwesenheit von Tetrazyklin bildet sich ein Komplex aus Tetrazyklin und tTA, der das TRE-Element nun nicht mehr binden und die Expression aktivieren kann. Die andere Möglichkeit ist das Tet-On-System, das eine mutierte Variante des tTA enthält, die nur in Abwesenheit des Tetrazyklin-Derivats Doxozyklin (Dox) an TRE bindet und daher als reverse tTA (rtTA) bezeichnet wird (Gossen et al. 1995).

Zur Herstellung eines Doxozyklin-induzierbaren Überexpressionssystems für CCN3 in SGHPL-5 Zellen wurde das Expressionssystem aus dem Addgene Plasmid 19766 (pLV-tetO-Oct4) (Stadtfeld et al. 2008) als Expressionsvektor und dem Addgene Plasmid 19780 (FuDeltaGW-rtTA) (Maherali et al. 2008) als reverser Tetrazyklin-Aktivator nach Konrad Hochedlinger verwendet. Hierfür wurde die Oct4-Sequenz über die EcoRI-Schnittstellen nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot) herausgeschnitten und die vollständige kodierende Region der humanen CCN3 cDNA (EMBL Datenbank Zugangsnummer X96584) aus dem Expressionsvektor pCMV-novH (S) (Chevalier et al. 1998) anstelle des Oct4 mittels T4 DNA Ligase nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt.

Die Virusproduktion erfolgte mithilfe der Helferplasmide Addgene Plasmid 12260 (psPAX2) als lentiviraler Verpackungsplasmid (engl.: *packaging plasmid*) der zweiten Generation und dem Addgene Plasmid 12259 (pMD2.G) als Hüllplasmid (engl.: *envelope plasmid*) nach Didier Trono in HEK 293T Zellen. Die HEK 293T Zellen wurden mittels der klassischen Kalziumphosphat-Methode (Graham und van der Eb 1973; Jordan et al. 1996) transfiziert, dabei fällt durch das Mischen einer DNA-Kalziumlösung mit einem Phosphatpuffer (HBS) ein DNA-Kalziumkomplex aus, der von den Zellen durch Phagozytose aufgenommen wird. Dazu wurden $2,5 \times 10^6$ HEK 293T Zellen pro 10 cm² Kulturschale ausgesät und nach 16 - 24 h transfiziert. Dazu wurden 20 µg des pLV-tetO-CCN3 Plasmids bzw. 20 µg des FuDeltaGW-rtTA Plasmids in getrennten Ansätzen mit je 15 µg des Verpackungsplasmides psPAX2 und je 6 µg des Hüllplasmides pMD2.G auf ein Gesamtvolumen von 500 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Dann wurde 500 µl 2× HBS zugegeben und durch Vortexen gemischt und anschließend wurden unter Vortexen noch 50 µl 2,5 M CaCl₂ zugegeben. Nach 25 minütiger Inkubation bei RT wurde das Medium von den Zellen abgenommen, die Mischung tropfenweise auf die Zellen gegeben und

6 ml frisches Medium dazugegeben. Nach 8 h wurde ein Mediumwechsel unter Zugabe von 20 mM Natriumbutyrat vorgenommen. Nach 16 h erfolgte ein weiterer Mediumwechsel ohne Zugabe von Natriumbutyrat und nach weiteren 24 h erfolgte die Virusernte. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen, durch einen 0,45 µm-Filter gegeben und der Virusüberstand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Für die lentivirale Gentransduktion wurden 3×10^5 SGHPL-5 Zellen/ Loch in 6-Lochplatten ausgesät und nach 24 h mit dem oben beschriebenen Virusüberstand infiziert. Dazu wurde je 1 ml frisches Medium mit 5 µl Polybrene/ ml Medium und anschließend tropfenweise 100 µl Virusüberstand in jedes Loch der 6-Lochplatte auf die Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Nach 48 h wurde der Virus durch viermaliges Waschen mit PBS von den Zellen entfernt und die Zellen wurden durch Zugabe von frischem Medium und mehrmaliges Passagieren (siehe Abschnitt 2.2.2) vermehrt, kryokonserviert (siehe Abschnitt 2.2.4) oder für Versuche verwendet.

Die Induktion der CCN3-Überexpression in den SGHPL-5/tetO-CCN3 Zellen erfolgte durch Zugabe von 0,1 µg/ml Doxyzyklin in das Kulturmedium. Verschiedene Doxyzyklin-Konzentrationen (0,1 – 0,5 µg/ ml) wurden auf Wirksamkeit und Toxizität getestet.

<i>Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
2× HBS (pH 7,0)	50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 12 mM Glukose

2.2.9 *In vitro* Proliferationsassay

5×10^4 Zellen/Loch wurden in 12-Lochplatten als technische Triplikate ausgesät und nach 24 h und 48 h Behandlung mit CCN1 und CCN3 ausgezählt, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben.

2.2.10 Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung

Für die Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung wurden 7×10^5 Zellen in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät. Nach 24 h Serumentzug zur Synchronisierung des Zellzyklus in der Kultur wurde das Experiment mit 5 % FCS und 1 µg/ml rhCCN1 oder rhCCN3 oder 1 % BSA in PBS als Lösungsmittelkontrolle für eine Dauer von 0 h, 4 h und 24 h durchgeführt. Bromodeoxyuridin (BrdU) wurde für die letzten beiden Stunden der Inkubationszeit der Kultur

zugegeben. Danach wurden die Zellen abtrypsiniert und bei $1000 \times g$ 3 min zentrifugiert. Zur Fixierung wurde das Zellpellet in 100 μ l BD Cytofix/ Cytoperm Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml $1\times$ BD Perm/ Wash Puffer aufgefüllt und 5 min bei $1000 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und das Zellpellet in 100 μ l BD Cytoperm Plus Puffer resuspendiert und zur Permeabilisierung 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde wieder mit 1 ml $1\times$ BD Perm/ Wash Puffer aufgefüllt und für 5 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μ l DNase resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert, um die DNA zu denaturieren und das während der DNA Synthese inkorporierte BrdU für den spezifischen FITC-konjugierten anti-BrdU Antikörper zugänglich zu machen. Der Ansatz wurde mit 1 ml $1\times$ BD Perm/ Wash Puffer aufgefüllt und 5 min bei $1000 \times g$ abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 μ l anti-BrdU FITC Antikörper resuspendiert und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit $1\times$ BD Perm/ Wash Puffer wurde das Zellpellet in 20 μ l 7-Aminoactinomycin (7-AAD) resuspendiert, um die Gesamt-DNA anzufärben. Alle verwendeten Puffer, Antikörper und das 7-AAD stammen aus dem FITC BrdU Flow Kit (BD PharmingenTM, San Jose, USA) und wurden nach Herstellerangabe verdünnt bzw. für den Gebrauch vorbereitet. Die Zellen wurden anschließend für die durchflusszytometrische Analyse (engl.: „fluorescence activated cell sorting“, FACS) verwendet. Mittels Zwei-Farben-Durchflusszytometrie wurden aktiv DNA synthetisierende Zellen (Fl-1, FA 150 CScalibur) und der Gesamt-DNA-Gehalt (Fl-3) bestimmt. Die Verteilung der Zellen in G0/1, S oder G2/M Phase wurde durch klassische DNA Profile bestimmt (Fl-3; Histogramm Plot des DNA-Gehaltes gegen die Zellzahl).

2.2.11 Apoptosedetektion mittels Annexin V Markierung und durchflusszytometrischer Analyse

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen wurden 9×10^4 Zellen/ Loch in 6-Lochplatten ausgesät. Nach 24 h Serumentzug wurde das Experiment mit 1 μ g/ml rhCCN1 oder rhCCN3 oder 1 % BSA in PBS als Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Durch Markierung des Phosphatidylserins mit FITC-Annexin V wurde der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch (FACSCalibur; Becton Dickinson, Heidelberg) mithilfe der Cell Quest Software (Becton Dickinson) bestimmt. Phosphatidylserin ist bei lebenden Zellen auf der Innenseite der Membran lokalisiert und wird nur bei apoptotischen Zellen auf die Außenseite transloziert. Um apoptotische von nekrotischen Zellen mit poröser Membran zu unterscheiden, wird mit Propidiumiodid gegengefärbt. Propidiumiodid kann nur in die nekrotischen Zellen mit poröser Membran eindringen, apoptotische Zellen sind daher Annexin V-positiv und PI-

negativ, nekrotische Zellen sind Annexin V-positiv und PI-positiv. Die Zellen wurden mit Fluoresceinisothiocynat (FITC)-konjugierten Annexin V und Propidiumiodid (PI; BD Bioscience Pharmingen) nach Angaben des Herstellers gefärbt. Dazu wurden die Zellen für 15 min mit FITC-konjugierten Annexin V und PI in Bindepuffer inkubiert und innerhalb 1 h durchflusszytometrisch bestimmt (FI)-1 und (FI)-3 (BD Transduction Labs). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung wurden mithilfe der WinMDI ausgewertet.

<i>Bindepuffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Bindepuffer	1,4 M NaCl; 25 mM CaCl ₂ ; pH 7,4

2.2.12 Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität

Zur Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität wurden 3×10^5 Zellen/Loch in 6-Lochplatten ausgesät. Das Experiment wurde mit 1 μ g/ml rhCCN1 oder rhCCN3 oder 1 % BSA in PBS als Lösungsmittelkontrolle für 48 h durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann für 15 min in 0,2 % Glutaraldehyd in PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen mit frisch angesetzter SA- β -gal Färbelösung für 24 h bei 37 °C inkubiert. Mittels eines Phasenkontrastmikroskops (10 \times Vergrößerung) wurden jeweils drei Aufnahmen pro Ansatz digital aufgenommen und manuell ausgezählt. Die Gesamtzellzahl und die Anzahl der positiv blau-gefärbten Zellen wurden gezählt und als SA- β -gal positive Zellen pro 100 Zellen dargestellt.

<i>Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
SA- β -gal Färbelösung	1 mg/ml X-Gal; 5 mM Kaliumferricyanid; 5 mM Kaliumferrocyanid; 2 mM MgCl ₂ in PBS; pH 6,0

2.2.13 Bestimmung der Zellmigration mittels Wundheilungsassay

Die Bestimmung der Zellmigration wurde mittels Wundheilungsassays und sterilen selbstklebenden Kultureinsätzen aus Silikon (engl.: *culture-inserts for self-insertion*; ibidi GmbH, Martinsried, Germany) durchgeführt. 2×10^4 Zellen wurden in beide Kammern der

Kultureinsätze ausgesät und zum Adhärenzieren für 24 h in normalem Kulturmedium inkubiert. Dann wurden die Zellen für weitere 24 h separat mit 1 µg/ml rhCCN1, rhCCN3 oder 0,1 % BSA in PBS als Lösungsmittelkontrolle in serumfreiem Kulturmedium vorinkubiert. Danach wurden die Kultureinsätze entfernt, sodass zwischen den beiden Zellfeldern eine definierte Lücke von 500 µm verblieb. Die Zellfelder wurden mit serumfreiem Kulturmedium und entsprechend der Vorinkubation mit 1 µg/ml rhCCN1, rhCCN3 oder 0,1 % BSA in PBS als Lösungsmittelkontrolle überschichtet. Die Migration der Zellen über die zellfreie Lücke wurde mit einem Axiovert 25 Phasenkontrastmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) nach 0 h und 24 h dokumentiert. Für die Dokumentation wurde eine AxioCamICCc1 Kamera und die AxioVision LE Release 4.8.2 Image Analysis Software verwendet.

2.2.14 Immunzytochemie

Die SGHPL-5 Zellen wurden auf sterilen Glasplättchen ausgesät und wie in Abschnitt **2.2.5** beschrieben mit rhCCN1 und rhCCN3 behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen mit 4 % PFA für 10 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 10 min bei RT in 1 % BSA in PBS inkubiert. Die primären Antikörper wurden in 1 % BSA in PBS verdünnt und 1,5 h bei RT inkubiert. Die sekundären Cy3- oder Alexa488-gekoppelten Antikörper wurden abgedunkelt 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 25 µg/ml in PBS) für 15 min bei Raumtemperatur abgedunkelt gegengefärbt. Als Einbettmittel wurde Mowiol verwendet. Hierfür wurde die DAPI-Lösung kurz mit ddH₂O abgespült und dann das Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf einen Mowioltropfen auf einem Objektträger gegeben. Die Präparate wurden zum Aushärten mindestens 24 h bei -4 °C im Dunkeln gelagert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica TCS SP5, Leica, Wetzlar) durchgeführt.

2.2.15 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllysaten wurde das Total RNA Kit (E.Z.N.A.) verwendet. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden in 350 µl TRK-Lysepuffer (E.Z.N.A. Total RNA Kit) mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst. Um eine vollständige Lysis zu gewährleisten, wurden die Zellen mehrmals durch eine Kanüle (Microlance™ 3, 27 G × ¾"; 0,4 x 19 mm, BD) aufgezogen. Die Gesamt-RNA wurde

anschließend nach Herstellerangaben des Total RNA Kits isoliert. Die Konzentration wurde im Photometer bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.16 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger Nukleinsäurelösungen kann anhand der Absorption von UV-Licht der Wellenlänge 260 nm im Vergleich zu einer Nukleinsäure-freien Referenz ermittelt werden. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA (Sambrook et al. 1989). Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung kann mit Hilfe des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm (OD_{260}) zur Absorption bei 230 nm (OD_{230}) bzw. 280 nm (OD_{280}) abgeschätzt werden. Der Vergleich mit der OD_{280} gibt Auskunft über die Verunreinigung mit Proteinen, da die am stärksten bei 260 nm absorbierenden aromatischen Purin- und Pyrimidinbasen bei 280 nm nur ein kleineres Maximum zeigen, wohingegen die aromatische Aminosäure Tryptophan, welche vor allem für die Absorption verantwortlich ist, ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm hat. Wenn der Quotient OD_{260}/OD_{280} im Bereich von 1,7 - 1,9 liegt, ist eine Kontamination der Nukleinsäurelösung mit Proteinen vernachlässigbar gering. Bei einem Wert von 2,0 oder darüber enthält die Lösung fast ausschließlich RNA. Der Quotient OD_{260}/OD_{230} ist ein Maß für den Salzgehalt der Lösung, da Salze Licht der Wellenlänge von 230 nm absorbieren. Zur Bestimmung der Konzentration wurden 2 µl der RNA- oder DNA-Lösung in 98 µl DEPC-H₂O verdünnt und die Konzentration anhand eines Eppendorf Photometers bestimmt. Als Leerwert-Abgleich wurde die Absorption von 100 µl DEPC-H₂O bestimmt.

2.2.17 Reverse Transkription (RT)

Zur Synthese von einzelsträngiger cDNA aus isolierter mRNA als Template für DNA-abhängige DNA-Polymerasen wurde das M-MLV-RT System der Firma Invitrogen eingesetzt, das die M-MLV Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, enthält. Für die cDNA-Synthese wurde zunächst ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurde 1 µg RNA mit DEPC-H₂O auf 8,5 µl aufgefüllt und mit 1 µl 10× DNase-Puffer und 1 µl DNase I (Invitrogen) für 15 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurden die RNA-Proben im Thermocycler für 10 min bei 65 °C inkubiert. Danach erfolgte die eigentliche Reverse Transkription mit 15 µl eines vorgefertigten Mastermixes, bestehend aus 5 µl 5× Puffer; 1,25 µl dNTP [10 mM]; 2 µl DTT [0,1 M]; 0,5 µl Oligo(dT)₁₈-Primer [0,5 µg/µl]; 0,5 µl M-MLV RT

[200 U/ μ l] und 5,75 μ l DEPC-H₂O. Die Umschreibung erfolgte für 1 h bei 37°C. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.2.18 DNA-Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Sequenzen können selektiv und spezifisch mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert werden (Mullis et al. 1986). Dabei synthetisiert die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) das Zielgen - ausgehend von einigen wenigen Molekülen des Zielgens als Matrize - sehr oft. Um mit der DNA-Synthese beginnen zu können, benötigt die Polymerase kurze Oligonukleotide am 3'- und am 5'-Ende der Sequenz, so genannte Primer, die die Anlagerung des Enzyms ermöglichen. Die Sequenzen der Primer stellen den identischen Beginn und das komplementäre Ende des Gens sowie einige zusätzliche Nukleotide dar und umfassen i.d.R. 20 - 25 Nukleotide je Primer. Zu Beginn der PCR wird die doppelsträngige DNA-Matrize in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen, indem der PCR-Ansatz einige Minuten auf 94 °C erhitzt wird. Dann folgen mehrere Zyklen aus jeweils drei Schritten:

1. Denaturierung Durch Erhitzen auf 94 - 98 °C wird die doppelsträngige *template*-DNA denaturiert, es liegen nun Einzelstränge vor.
2. Hybridisierung Für die Hybridisierung der Primer an die komplementären Abschnitte der *template*-DNA, wird die Temperatur auf 3-5 °C unter den Schmelzpunkt der beiden Primer gesenkt.
3. Elongation Die Temperatur wird auf das Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase (68 – 72 °C) erhöht. Die DNA-Polymerase verlängert den Primer komplementär zur *template*-DNA.

In jedem neuen Zyklus stehen mehr Sequenzen des Zielgens als Matrize zur Verfügung, so dass die Anzahl der erwünschten DNA-Moleküle exponentiell ansteigt.

Standard-PCR-Ansatz

4 µl	Template (RT-Ansatz)
5 µl	10× PCR-Puffer
1 µl	dNTPs [10 mM]
1 µl	Primer (Sense und Antisense) [25 pmol/µl]
0,5 µl	DNA-Polymerase [5 U/µl]
Ad 50 µl	ddH ₂ O

Standard-PCR-Programm

1. Initiale Denaturierung	94 °C	2 Minuten	
2. Denaturierung	94 °C	45 Sekunden	
3. Primer-Hybridisierung	60 °C	45 Sekunden	× 40
4. Elongation	72 °C	2 Minuten	
5. Finale Elongation	72 °C	5 Minuten	

Die Temperatur während der Primer-Hybridisierung sollte 3 - 5 °C unter der Schmelztemperatur der beiden verwendeten Primer liegen und kann nach folgender vereinfachter Formel berechnet werden:

$$T_m = (2 * (A + T) + 4 * (G + C)) - 5$$

Eine zu niedrige Hybridisierungstemperatur führt zu unspezifischer Bindung der Primer, eine zu hohe Hybridisierungstemperatur kann die Bindung an die komplementäre Zielsequenz verhindern. Die Temperatur als auch die Länge der Elongationsreaktion hängen von der verwendeten Polymerase ab, bei der verwendeten Taq-Polymerase liegt das Temperaturoptimum bei 72 °C. Die Elongationsdauer hängt von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz ab, die Taq-Polymerase synthetisiert etwa 1000 bp pro Minute. Der Deckel hat eine Temperatur von 105 °C, um zu verhindern, dass Wasserdampf an den Deckeln

der PCR-Reaktionsgefäße kondensiert. Für die Amplifikation eines Gens werden 40 Zyklen aus den Schritten 2 - 4 durchgeführt.

2.2.19 DNA-Gelelektrophorese

Die spezifische Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch Gelelektrophorese in einem 2 % TBE-Agarosegel überprüft. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen wandern Nukleinsäuren in einer Gelmatrix mit definierter Porengröße bei Anlegen eines elektrischen Felds zur positiv geladenen Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld ist proportional zu ihrer Ladungsdichte und umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Da die Ladungsdichte durch die gleiche Anzahl von Ladungen pro Nukleotid für alle Nukleinsäuren gleich groß ist, hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe eines DNA-Fragments ab, Nukleinsäuren können also nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Als Größenstandard wurden 5 µl einer 100 bp DNA-Standard-Leiter aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erfolgte für ca. 1 h bei 120 V. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Agarosegel 0,5 mg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht sie aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften im UV-Licht sichtbar. Die Dokumentation wurde an dem Geldokumentationssystem Herolab SU-1 vorgenommen.

<i>Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Agarosegel (2%)	2 % (w/v) Agarose; 100 % (v/v) 1× TBE-Puffer (pH 8,2) 0,005 % (v/v) EtBr (10 mg/ml)
1× TBE-Puffer (pH 8,2)	89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA

2.2.20 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die gewünschte PCR-Bande wurde fragmentnah unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „E.Z.N.A. GelExtraction Kits“ der Firma Omega Bio-Tek laut Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert. Das Gelstück mit der DNA wurde im gleichen Volumen Bindepuffer gelöst, auf eine HiBind® Spinsäule aufgetragen und die DNA nach drei Waschschritten und in zwei Schritten mit 30 µl und 20 µl Elutionspuffer

(10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert. Die Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung wurde photometrisch, wie in Abschnitt **2.2.16** beschrieben, gemessen.

2.2.21 Herstellung von Standardreihen für die quantitative Real-Time PCR

Die aufgereinigten DNA-Fragmente (siehe Abschnitt **2.2.20**) wurden zur Herstellung von Standardreihen für die quantitative Real-Time PCR verwendet. Dazu wurde aus den cDNA-Lösungen eine serielle Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1 pg/μl, 100 fg/μl, 10 fg/μl, 1 fg/μl, 0,1 fg/μl hergestellt. Alle Standardreihen wurden in einer Real-Time PCR getestet, die Spezifität der Produkte durch eine Schmelzkurvenanalyse bestätigt und die PCR-Produkte durch DNA-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt **2.2.19**) überprüft.

2.2.22 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR ermöglicht die Quantifizierung von Nucleinsäuren mittels eines Fluoreszenzsignals, dass proportional während der Amplifikation eines PCR-Produktes entsteht. Die Quantifizierung wird nach Durchlauf aller Zyklen aus den während der exponentiellen Phase der PCR detektierten Fluoreszenzsignalen vorgenommen. Dadurch lassen sich sowohl die Templatemenge in einer Reaktion (absolute Quantifizierung) als auch Unterschiede in der Templatemenge zwischen verschiedenen Proben (relative Quantifizierung) quantifizieren. In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung mithilfe des Power SYBR® Green PCR Master Mix durchgeführt und an einem ABI Prism 7300 Sequence Detection System mit folgendem Temperaturprofil gemessen und ausgewertet.

Real-Time PCR-Programm

1. Uracil-DNA-Glycosylase (UNG) Aktivierung	50 °C	2 Minuten	
2. Hot Start Polymerase Aktivierung	95 °C	10 Minuten	
3. PCR-Zyklus (Denaturierung)	95 °C	15 Sekunden	× 45
(Primer-Hybridisierung/ Elongation)	60 °C	1 Minute	
4. Dissoziierungsschritte für SYBR Green	95 °C	15 Sekunden	
	60 °C	30 Sekunden	
	95° C	15 Sekunden	

Die Aktivierung der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase und die initiale Denaturierung erfolgten bei 95 °C für 10 min, gefolgt von 45 PCR-Zyklen mit 95 °C für 15 sec und 60 °C für 1 min zur Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation, sowie einer anschließenden Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte bei 95 °C für 15 sec, 60 °C für 30 sec und 95 °C für 15 sec.

Die Reaktionsansätze wurden nach dem folgenden Schema in technischen Triplikaten angesetzt. 19 µl des Real-Time PCR-Ansatzes ohne cDNA wurde in die Vertiefungen einer 96er-Lochplatte vorgelegt und anschließend 1 µl der cDNA zugegeben.

Real-Time PCR-Ansatz

10 µl	2x Power SYBR® Green PCR Master Mix
0,15 µl	Primer (Sense und Antisense) [25pmol/µl]
8,7 µl	ddH ₂ O
1 µl	cDNA (Reverser Transkriptionsansatz)

Die relative Genexpressionsrate eines Zielgens wurde mittels des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens β -Aktin bestimmt. Als passive Referenz zur Normalisierung der nicht zur PCR gehörigen Fluoreszenzschwankungen diente der im Power SYBR® Green PCR Master-Mix enthaltene ROX™ Farbstoff. Zur quantitativen Bestimmung der Expressionswerte wurden

Standardkurven der spezifischen Produkte und des Haushaltsgens β -Aktin (siehe Abschnitte 2.2.18 - 2.2.21) erstellt.

2.2.23 Proteinextraktion aus Zelllinien

Zur Extraktion der Proteine aus kultivierten Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, 1× mit PBS gewaschen und in 350 μ l NETN-Puffer mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst. Das Zelllysate wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit einer Kanüle (Microlance™ 3, 27 G \times 3/4"; 0,4 x 19 mm, BD) homogenisiert und gevortext. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis wurde das homogenisierte Zelllysate erneut gevortext und die Zelltrümmer bei 4 °C und 13.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Bestimmung der Proteinkonzentration bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
NETN	20 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 1mM EDTA; 0,4 % IGEPAL® CA-630 Proteasehemmer Inhibitor Complete EDTA-free Phosphatase Inhibitor PhosSTOP

2.2.24 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde mit Hilfe von Roti®-Quant bestimmt (Bradford 1976). Die Roti®-Quant Lösung enthält den Farbstoff Coomassie Brilliantblau-G250 (CBBG250), der in saurer Lösung an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen bindet. Dieser Vorgang ist in Form eines Farbumschlags von rötlichbraun nach blau messbar – ungebunden liegt das Absorptionsmaximum von CBBG250 bei 465 nm, in der gebundenen Form bei 595 nm. Für die Messung wurden 2 μ l Proteinlösung in 798 μ l ddH₂O und mit 200 μ l Roti®-Quant Lösung gemischt (1 : 500 Verdünnung), gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Als Leerwert wurden 800 μ l ddH₂O mit 200 μ l Roti®-Quant Lösung gemessen. Anschließend wurde in einem Photometer bei 595 nm die Absorption der Proteinlösungen gemessen und anhand einer Eichkurve die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt. Die Eichkurve wurde zuvor unter Verwendung von BSA-Lösungen mit bekannter

Konzentration (1 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml und 20 µg/ml) erstellt. Die Konzentrationen wurden durch folgende Formel ermittelt:

$$\frac{(E_{\text{Probe}} \div E_{\text{StandardMittelwert}}) \times 500}{1000}$$

2.2.25 Diskontinuierliche SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen kann die diskontinuierliche SDS – Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS - PAGE, SDS: engl. sodium dodecylsulphate – Natriumdodecylsulfat) angewandt werden. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat bildet ein Anion, das sich gleichmäßig an Aminosäuren anlagert. Dies führt zur Entfaltung und Denaturierung von Proteinen. Um eine vollständige Denaturierung des Proteins zu erreichen, werden die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt und intra- und intermolekulare Disulfidbrücken durch Zugabe des Reduktionsmittels β-Mercaptoethanol gespalten.

Die negativen Ladungen der Sulfatgruppe befinden sich an der Oberfläche des SDS-Protein-Komplexes, so dass die Eigenladung des Proteins vernachlässigt werden kann, da sie im Komplex mit SDS unabhängig vom pH-Wert der umgebenden Lösung ist. Da ein SDS-Molekül im Durchschnitt zwei Aminosäuren bindet, ist die negative Ladung des SDS-Protein-Komplexes proportional zur Anzahl der Aminosäuren des Proteins und infolgedessen auch ungefähr zu dessen Molekulargewicht. Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts können also in einem Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden, indem sie einer auf der Ladung beruhenden Trennung unterzogen werden. Zur Erhöhung der Trennschärfe werden die Proteine dabei zunächst aufgrund eines pH-Sprungs zwischen Sammelgel (pH 6,8) und Trenngel (pH 8,8) fokussiert. Im Sammelgel werden die Proteine zwischen den Chloridionen mit hoher Mobilität (Leitton) und dem Glycin mit niedriger Mobilität (Folgeion) gesammelt. Die SDS-Protein-Komplexe wandern also aufgrund ihrer mittleren Mobilität mit gleicher Geschwindigkeit in einer scharfen Bande zwischen Leit- und Folgeion bis zum Trenngel. Im Trenngel erhöht das Glycin aufgrund des geänderten pH-Wertes seine negative Ladung, so dass es die Proteine überholt und die SDS-Protein-Komplexe nun in den engen Poren des Trenngels entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell wandern. Größere Proteine wandern dabei langsamer als kleinere, sodass mithilfe der SDS-PAGE nicht nur Proteine getrennt werden können, sondern auch bestimmte Proteine anhand ihres Molekulargewichts in Relation zu einem mit aufgetragenen Größenstandard identifiziert

werden können. Zur Denaturierung wurden die Proteinproben 1 : 6 mit 6× SDS-Probenpuffer verdünnt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht, anschließend in die Taschen des Sammelgels gegeben und für ca. 30 min bei 80 V im Sammelgel laufen gelassen. Nach Erreichen des Trenngels erfolgte die Auftrennung der Proben bei 140 V für 1,5 – 2 h.

<i>Puffer/ Acrylamidgel</i>	<i>Zusammensetzung</i>
6× SDS Probenpuffer	70 % (v/v) 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 30 % (v/v) Glycerin; 1 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,0012 % (w/v) Bromphenolblau
10× SDS Laufpuffer	250 mM Tris; 2,5 M Glycin; 1 % (w/v) SDS
12 % Trenngel	34 % (v/v) ddH ₂ O; 25 % (v/v) Lower Tris (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS); 40 % (v/v) Acrylamid (30 : 0,8); 1 % (v/v) 10 % APS; 0,04 % (v/v) TEMED
4 % Sammelgel	60 % (v/v) ddH ₂ O; 25 % (v/v) Upper Tris (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS); 13,32 % Acrylamid (30 : 0,8); 1 % (v/v) 10 % APS; 0,1 % (v/v) TEMED

2.2.26 Transfer der Proteine auf eine Membran - Semidry Western Blot

In der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine können durch den Western Blot aus dem Trenngel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Die Proteine werden dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Nitrozellulosemembran immobilisiert, so dass das Trennmuster des ursprünglichen Gels auf der Membran erhalten bleibt. In dieser Arbeit erfolgte der Transfer der Proteine auf Hybond-C Nitrozellulosemembranen (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Membranen, Trenngele und Whatman-Filterpapiere wurden 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Ausgehend von der Kathode wurden vier Whatman-Filterpapiere, die Membran, das Trenngel und wieder vier Whatman-Filterpapiere aufeinander gelegt und luftblasenfrei zwischen in die Blot-Kammer gebettet. Der Transfer wurde in einer Semidry Blot-Apparatur (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, München) bei 70 mA pro Gel für 90 min durchgeführt. Zur Kontrolle der Proteinübertragung wurden die Membranen reversibel mit Ponceau-Rot gefärbt und anschließend mit dreimaligem Waschen in TBS-T wieder entfärbt.

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Transferpuffer	39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,037% SDS (w/v); 20 % Methanol (v/v)
TBS-T	150 mM NaCl; 20 mM Tris; 0,1% (v/v) Tween-20; pH 7,6

2.2.27 Detektion und Visualisierung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die Nitrozellulosemembranen wurden zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T für 1 h bei RT inkubiert. Einzelne Proteine wurden mit einem primären Antikörper gegen das entsprechende Protein und einem sekundären, mit Peroxidase (engl.: „Horseradish peroxidase“, HRP) markierten, Antikörper gegen den primären Antikörper nach der Methode von Hawkes et al. (1982) nachgewiesen. Der primäre Antikörper wurde für 1,5 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für 5 min bei RT, wurden die Membranen mit den HRP-markierten sekundären Antikörpern für 90 min bei RT inkubiert und anschließend dreimal für 5 min gewaschen. Zur Visualisierung wurde das ECL-System (Thermo-Scientific), das auf der Methode der Chemilumineszenzreaktion nach basiert (Towbin und Gordon 1984), nach Herstellerangaben angewendet. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols und löst damit eine Chemilumineszenz aus und das entstehende Licht kann durch Auflegen eines Röntgenfilms in einer Expositionskassette gemessen werden. Die Intensität des emittierten Lichts ist dabei proportional zu der Proteinmenge, sodass die Intensität der auf dem Röntgenfilm entstandenen Banden Aufschluss über die relative Menge des jeweiligen Proteins gibt. Um weitere Proteine auf der gleichen Membran nachzuweisen, wurde diese entweder vor der Antikörperinkubation an geeigneter Stelle geschnitten, oder bei Proteinen mit gleichem oder sehr ähnlichen Molekulargewicht für 30 min bei 60 °C in Strippingpuffer gestrippt, erneut geblockt und mit primärem und sekundärem Antikörper wie oben beschrieben inkubiert. Die detektierten Banden wurden aufgrund ihrer Zuordnung zu einem mitgeführten rekombinanten Proteinstandard identifiziert (siehe Abschnitt 2.1.5). Als Gelbeladungskontrolle und zur Normalisierung wurden stabil exprimierte Haushaltsgene wie α -Tubulin, β -Aktin oder GAPDH nachgewiesen. Die fertig entwickelten und fixierten Röntgenfilme wurden eingescannt und mit dem Programm TINA 2.09g (Straubenhardt, Germany) densitometrisch analysiert.

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Strippingpuffer	62,5 mM Tris, pH 6,7; 2 % (w/v) SDS; 100 mM β -Mercaptoethanol

2.2.28 Statistische Auswertungen der Expressionsdaten

Die statistische Auswertung der Expressionswerte von jeweils drei unabhängigen Experimenten wurde mit dem Statistikprogramm PASW Statistics 18 durchgeführt und der Mann-Whitney-U-Test für den nichtparametrischen Vergleich zweier unabhängiger Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau, d.h. die Obergrenze der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit einem Wert von $P = 0,05$ festgelegt und gilt damit als statistisch signifikant. Die Ergebnisse wurden zur Veranschaulichung in Diagrammen mit Mittelwerten und Standardfehlern dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von CCN1 und CCN3 und von Trophoblast-spezifischen Genen in der humanen Trophoblastzelllinie SGHPL-5

Zur Analyse der Regulationsmechanismen von CCN1 und CCN3 in der Trophoblastproliferation und –migration wurde als Modellorganismus die benigne plazentare Trophoblastzelllinie SGHPL-5 verwendet und auf EVT-Markergene getestet.

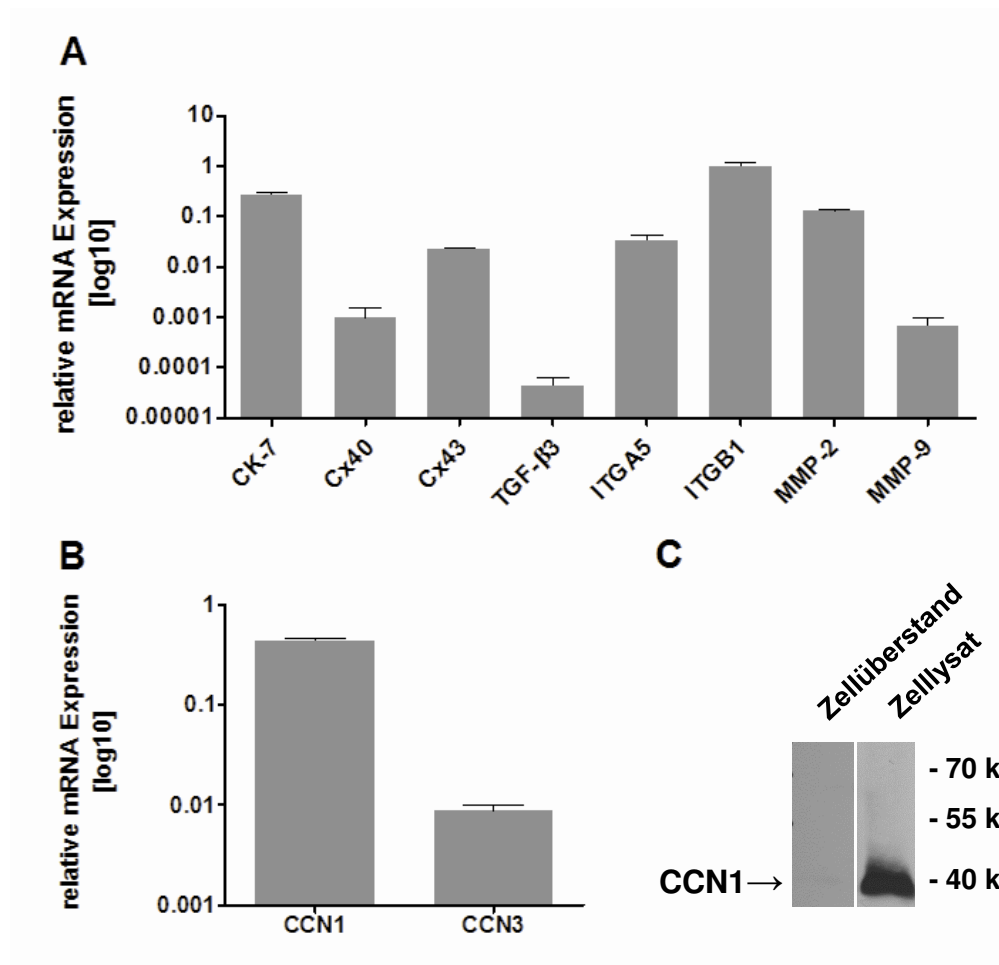


Abb. 8: Expression von Trophoblast-spezifischen Genen sowie CCN1 und CCN3 in der Zelllinie SGHPL-5

(A) Relative mRNA Expression der Trophoblast-spezifischen Gene *Cytokeratin-7* (CK-7), *Matrixmetalloproteinase 2* und *9* (MMP-2, MMP-9), *Connexin 40* und *43* (Cx40, Cx43), *Transforming growth factor beta 3* (TGF- β 3) und *Integrin α 5* und *β 1* (INT- α 5, INT- β 1) in der Trophoblastzelllinie SGHPL-5; n = 3. (B) Relative mRNA Expression der Gene *Cysteine-rich angiogenic inducer 61* (CCN1/ CYR61) und *Nephroblastoma overexpressed* (CCN3/ NOV) in der Trophoblastzelllinie SGHPL-5; n = 3. (C) Nachweis der intrazellulären, unglykosylierten Form des CCN1 Proteins (~40kDa) in SGHPL-5 Zelllysaten.

SGHPL-5 Zellen zeichnen sich durch eine Expression des Trophoblast-spezifischen Gens, einem Epithelzellmarker, *Cytokeratin-7* (CK-7) aus (Maldonado-Estrada et al. 2004) (siehe **Abb. 8A**). Die Zelllinie zeigt sowohl die für villöse Zytotrophoblastzellen und Synzytotrophoblastzellen charakteristische Expression von *Connexin 43* (Cx43) (Cronier et al. 2002), als auch die Expression des für proximale Zytotrophoblastzellen der Zellsäule spezifischen *Connexin 40* (Cx40) (Winterhager et al. 1999; Cronier et al. 2002) (siehe **Abb. 8A**). *Transforming growth factor beta 3* (TGF- β 3) spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese und Trophoblastdifferenzierung (Caniggia et al. 1999) und kann ebenfalls in SGHPL-5 Zellen detektiert werden (siehe **Abb. 8A**). Die für den invasiven EVT charakteristische Expression der Untereinheiten α 5 und β 1 des Transmembranproteins *Integrin α 5 β 1* (ITGA5 und ITGB1) kann auch in SGHPL-5 Zellen nachgewiesen werden und spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion und Signalübermittlung mit matrizellulären CCN-Proteinen wie z.B. CCN3 (Ellis et al. 2003; Lin et al. 2003) (siehe **Abb. 8A**). Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind an der Zellmigration und -invasion beteiligt (Werb 1997), in SGHPL-5 Zellen wird hauptsächlich MMP-2 und auf geringem Level auch MMP-9 exprimiert (siehe **Abb. 8A**). CCN1 mRNA wird in SGHPL-5 Zellen stark, CCN3 mRNA nur auf einem geringen Level exprimiert (siehe **Abb. 8B**). Während das Expressionslevel von CCN3-Protein unterhalb der Detektionsgrenze des Western Blots lag, konnte die unglykosylierte intrazelluläre Form des CCN1 Protein im Western Blot nachgewiesen werden. CCN3 besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen in seiner Sequenz (Chevalier et al. 1998), durch Endoglykosidasen-Verdau konnte in CCN3-überexprimierenden Jeg3 Zellen eine unglykosylierte intrazelluläre Form (48 kDa) und eine sezernierte N-glykosylierte Form (55 kDa) nachgewiesen werden, die unterschiedliche Funktionen in der Regulation der Migrations- und Proliferationseigenschaften aufweisen (Yang et al. 2011). Die glykosylierte sezernierte Form des CCN1 Proteins konnte im Zellüberstand nicht nachgewiesen werden (siehe **Abb. 8C**). Der Glykosylierungsstatus wurde untersucht, da sich hier unterschiedliche physiologische Funktionen ergeben könnten. Die spezifischen Glykosylierungsstellen für CCN1 sind bisher nicht bekannt.

3.2 Doxyzyklin-induzierbare Überexpression von CCN3 in lentiviral transduzierten SGHPL-5/ tetO-CCN3

Da die ursprünglichen SGHPL-5 Zellen kaum CCN3 exprimieren, sind sie die ideale Zelllinie, um die Rolle von CCN3 einmal durch Behandlung mit rekombinantem Protein von außen, aber auch durch Transfektion auf die Wirkung des endogenen CCN3 hin zu untersuchen. Um die endogene Expression von CCN3 steuern zu können, wurden SGHPL-5 Zellen mit einem Doxyzyklin-induzierbaren Tet-On System lentiviral transfiziert, dass das vollständige humane CCN3 Protein kodiert. Die SGHPL-5/ tetO-CCN3 Transfektanten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Doxyzyklin auf die Expression des CCN3 Proteins überprüft (siehe **Abb. 9A und B**). Im Vergleich zu der nicht induzierten Kontrolle (K) zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression des intrazellulär vorkommenden CCN3 bei einer Größe von ~42 kDa (siehe **Abb. 9A**). Die sezernierte Form von CCN3 mit einer Größe von ~55 kDa konnte im Zellüberstand von Doxyzyklin-behandelten SGHPL-5/ tetO-CCN3 Zellen nachgewiesen werden und war im Vergleich zu der Kontrolle signifikant erhöht (siehe **Abb. 9B**). Eine Doxyzyklin Konzentration von 0,1 µg/ml erwies sich hierbei als ausreichend, um die Expression von CCN3 über das Tet-On System zu induzieren (siehe **Abb. 9A und B**). Die immunzytochemische Analyse zeigte ein gleichmäßiges Vorkommen des CCN3 Proteins im Zytoplasma (siehe **Abb. 9C**).

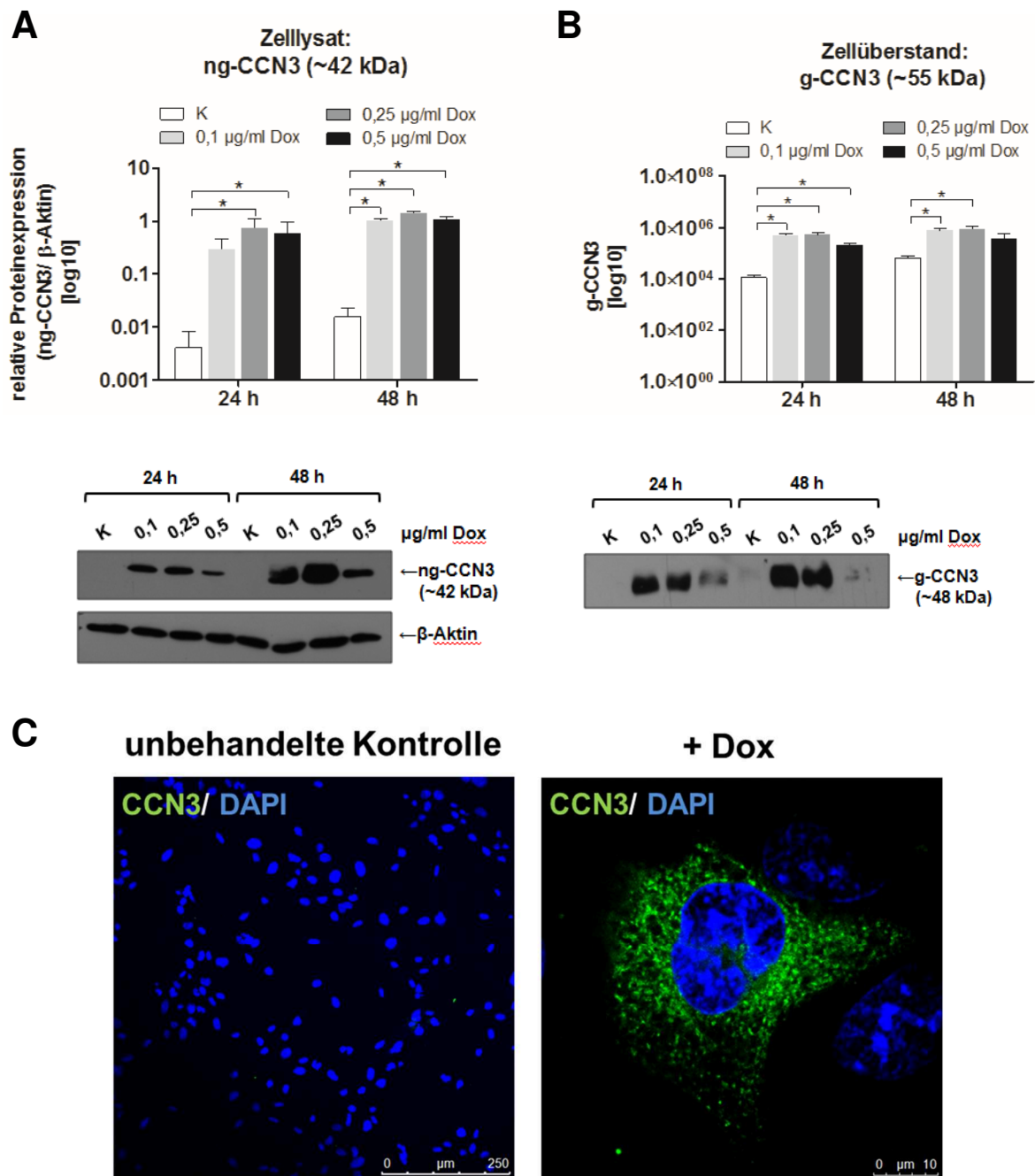


Abb. 9: Doxyzyklin-induzierbare Überexpression von CCN3 in lentiviral transfizierten SGHPL-5/tetO-CCN3

(A) Expression und relative Menge des intrazellulären unglykosylierten CCN3 (ng-CCN3) in SGHPL-5/tetO-CCN3 Zellen nach 24- und 48-stündiger Induktion mit 0,1; 0,25 und 0,5 μ g/ml Doxyzyklin (Dox) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K). Dargestellt ist die densitometrische Auswertung ($n = 3$) und ein exemplarischer Western Blot im Abgleich zu β -Aktin. (B) Sezerniertes glykosyliertes CCN3 (g-CCN3) im Zellüberstand von SGHPL-5/tetO-CCN3 Zellen nach 24 und 48 stündiger Induktion mit 0,1; 0,25 und 0,5 μ g/ml Doxyzyklin (Dox) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K). Es wurde kein Abgleich zu einem Haushaltsgen vorgenommen, da das sezernierte Protein aus dem Zellüberstand nachgewiesen wurde. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung ($n = 3$). (C) Lokalisation von CCN3 in SGHPL-5/tetO-CCN3 Zellen nach 24-stündiger Induktion mit 0,1 μ g/ml Dox; unbehandelte Kontrolle: SGHPL-5/tetO-CCN3 Zellen ohne Doxyzyklin-Behandlung. * $P \leq 0,05$.

3.2 Proliferation

3.2.1 CCN1 und CCN3 haben eine proliferationshemmende Wirkung auf SGHPL-5 Trophoblastzellen

Anhand der malignen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 konnte gezeigt werden, dass CCN3 die Proliferation reduziert und die Migration fördert (Yang et al. 2011; Wagener et al. 2013). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Regulation des Proliferationsverhaltens anhand der benignen plazentaren Trophoblastzelllinie SGHPL-5 durch Behandlung mit humanen rekombinanten CCN Proteinen (ng-rhCCN1/3 und g-rhCCN1/3) weiter analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass beide Glykosylierungsformen der CCN1 und CCN3 Proteine die Proliferation von SGHPL-5 Trophoblastzellen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduzieren, wobei g-rhCCN1 und ng-rhCCN3 im Hinblick auf die Gesamtzellzahl den stärksten Effekt aufwiesen (siehe **Abb. 10A**). Dieses Ergebnis korreliert mit der verminderten Expression des Proliferationsmarkers KI-67 durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 (siehe **Abb. 10B**).

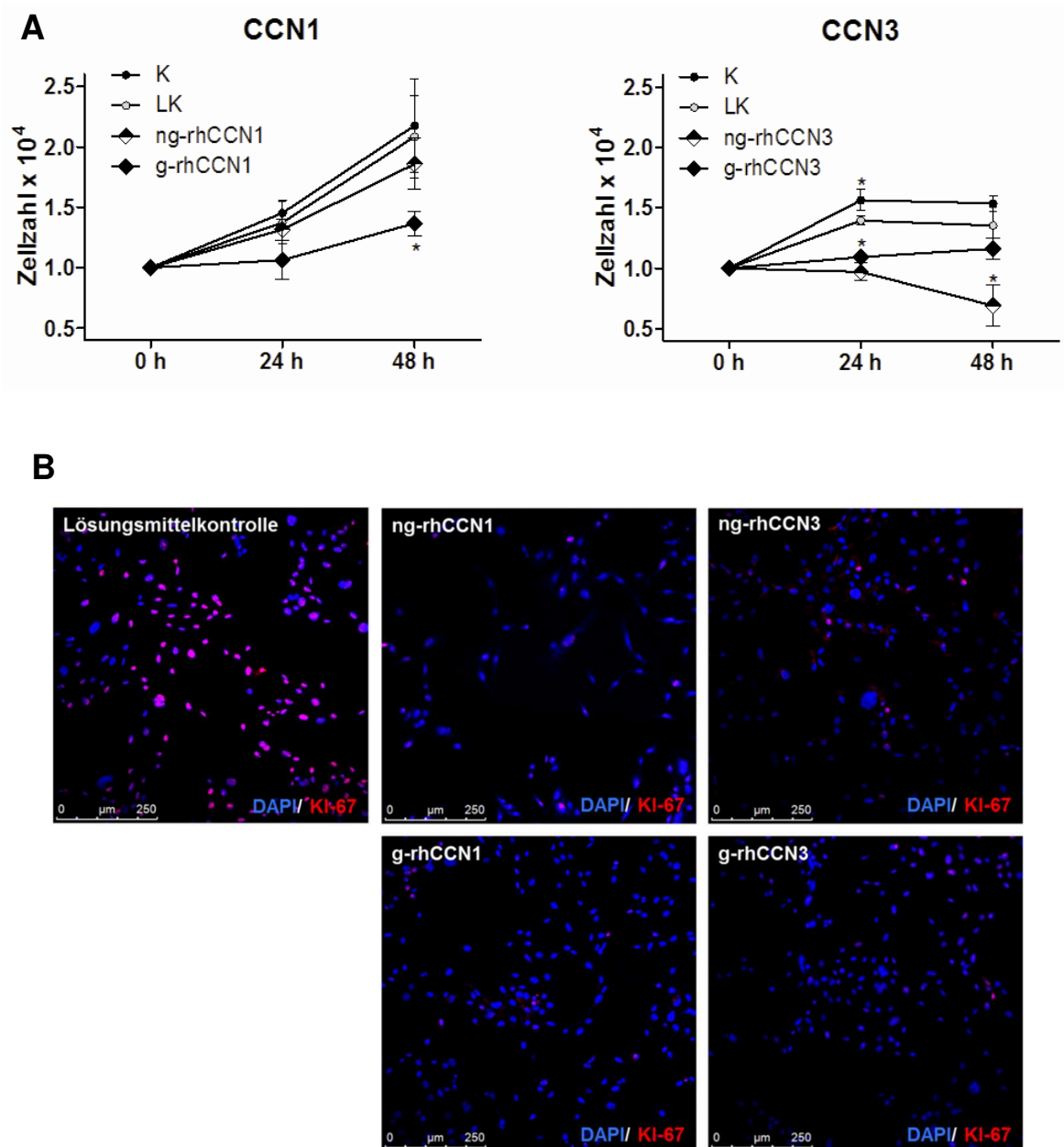


Abb. 10: CCN1 und CCN3 haben eine proliferationshemmende Wirkung auf die Trophoblastzelllinie SGHPL-5

(A) Wirkung von CCN1 und CCN3 auf die Gesamtzellzahl der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 nach 24 h und 48 h. Nach Behandlung mit 1 µg/ml rekombinatem g-rhCCN1 und ng-/ g-rhCCN3 für 24 h und 48 h ist die Gesamtzellzahl im Vergleich zu den Kontrollen signifikant geringer; (n = 3); (* $P \leq 0,05$). (B) Die verminderte Zellzahl korreliert mit der reduzierten Expression des Proliferationsmarkers KI-67; (n = 1). K = unbehandelte Kontrolle, LK = Lösungsmittelkontrolle (PBS/ 1 % BSA).

Um die Gründe für die reduzierte Proliferation im Detail zu analysieren, wurden weitere Aspekte des Zellverhaltens untersucht, die im Zusammenhang mit reduzierter Zellproliferation stehen können. So konnte eine leichte Steigerung der Zellablösung durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 festgestellt werden (siehe **Abb. 11A**). Weder die

glykosylierte noch die unglykosylierte Form von CCN3 hatten einen Einfluss auf den Anteil apoptotischer Zellen. Mittels Annexin V Bindungsassay konnte lediglich eine signifikante Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit g-rhCCN1 festgestellt werden (siehe **Abb. 11B**). Die Proteinexpression von phosphoryliertem p53 und der Caspase-3 blieb jedoch unverändert (siehe **Abb. 12A und B**).

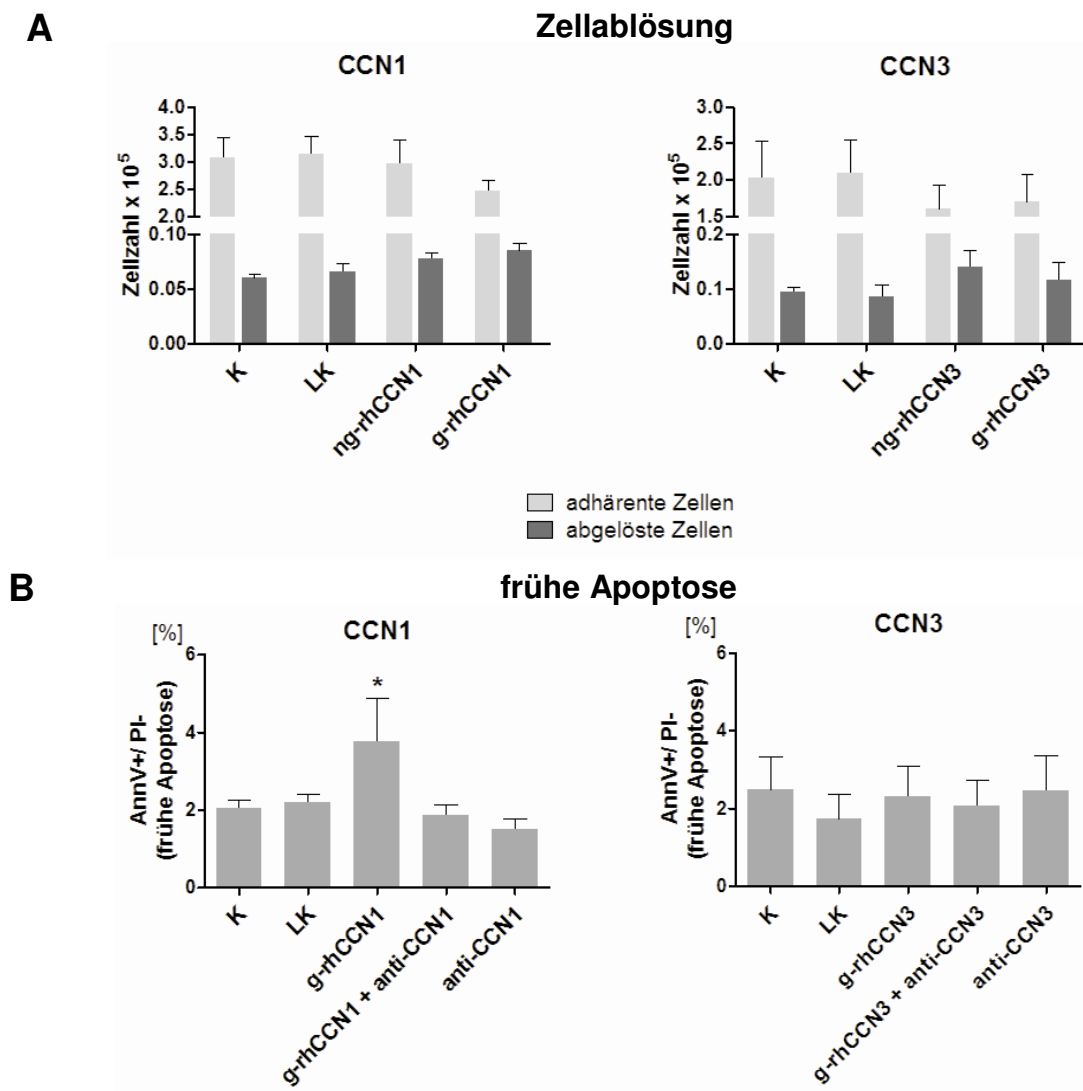


Abb. 11: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die Zellablösung und frühe Apoptose von SGHPL-5 Zellen

(A) Sowohl die glykosylierte als auch die unglykosylierte Form von CCN1 und CCN3 verursachen nach 24-stündiger Behandlung eine geringfügige, aber nicht signifikante Steigerung der Zellablösung. (B) Der Anteil von Zellen mit Anzeichen früher Apoptose (Annexin V-positiv und PI-negativ) erhöht sich nach 24-stündiger Behandlung mit glykosyliertem CCN1 signifikant. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; (n = 3); (*P ≤ 0,05).

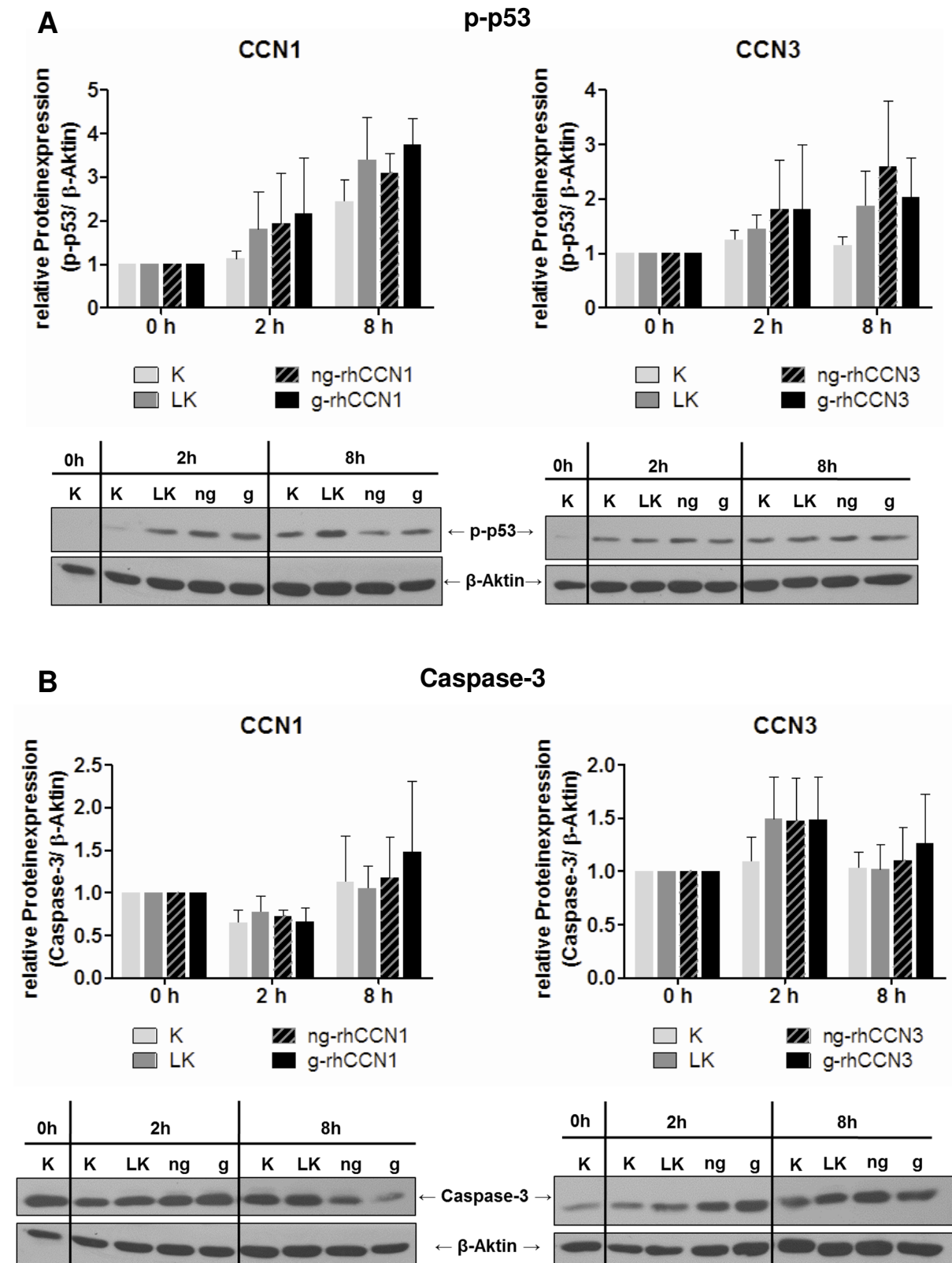
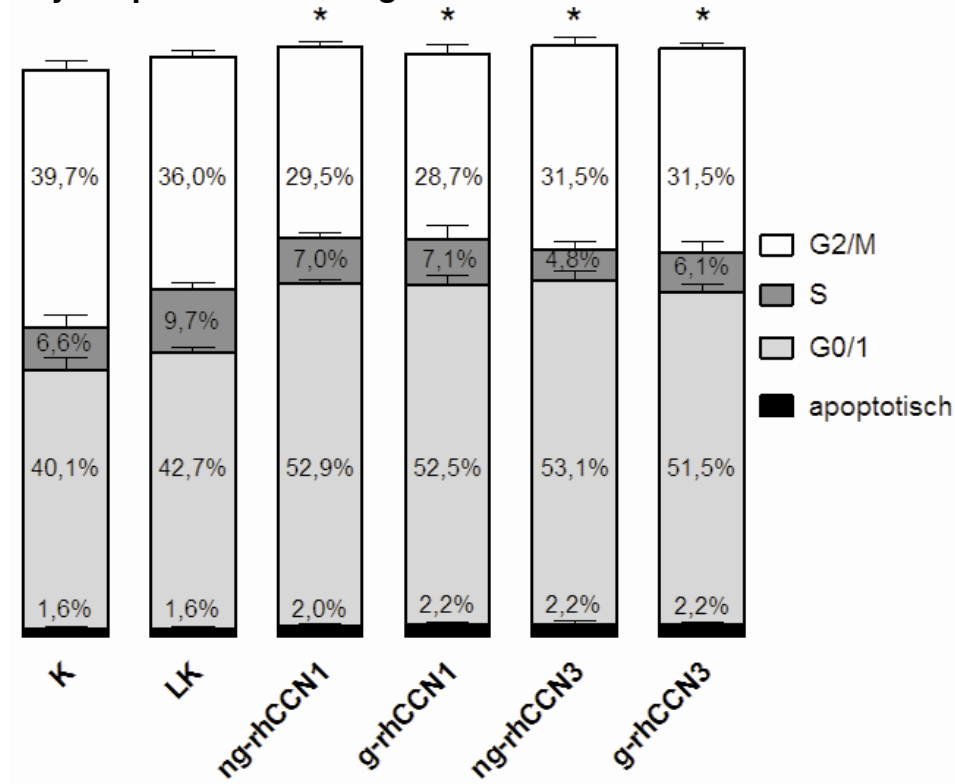


Abb. 12: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die Proteinexpression von phospho-p53 und Caspase-3 in SGHPL-5 Zellen

Proteinexpression von (A) phospho-p53 (p-p53) und (B) Caspase-3 nach zwei- und achtstündiger Behandlung mit 1 μ g/ml unglykosyliertem (ng) oder glykosyliertem (g) CCN1/3. Dargestellt sind die densitometrische Auswertung (n = 3) und jeweils ein exemplarischer Western Blot. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; (n = 3); (*P \leq 0,05).

Um den Zellzyklus unter dem Einfluss von CCN-Proteinen näher zu untersuchen, wurde die Anzahl der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen mittels durchflusszytometrischer Analyse über die aktive DNA-Synthese (BrdU-Inkorporation) und den DNA-Gesamtgehalt bestimmt. Die Analyse der Zellzyklusphasenverteilung zeigte, dass CCN1 und CCN3 den Arrest eines signifikant größeren Anteils der Zellen in der G0/1-Phase des Zellzyklus bewirken. Unglykosyliertes ($52,9 \pm 0,6 \%$) und glykosyliertes ($52,5 \pm 2,7 \%$) CCN1, sowie unglykosyliertes ($53,1 \pm 2,6 \%$) und glykosyliertes ($51,5 \pm 2,2 \%$) CCN3 verursachen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle K ($40,1 \pm 1,5 \%$) und der Lösungsmittelkontrolle LK ($42,7 \pm 0,9 \%$) einen Anstieg der G0/1-Zellen-Fraktion um ca. 10 %. Der Anteil der in der G2/M-Phase befindlichen Zellen wurde durch unglykosyliertes ($29,5 \pm 1,4 \%$) und glykosyliertes ($28,7 \pm 1,9 \%$) CCN1, unglykosyliertes ($31,5 \pm 2,2 \%$) und glykosyliertes ($31,5 \pm 1,4 \%$) CCN3 signifikant verringert. Unglykosyliertes CCN3 bewirkte zudem einen signifikant verringerten Anteil der Zellen in der S-Phase ($4,8 \pm 1,4 \%$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle K ($6,6 \pm 1,4 \%$) und der Lösungsmittelkontrolle LK ($9,7 \pm 1,1 \%$) (siehe **Abb. 13A**). Um zu untersuchen, ob CCN1 und CCN3 aus dem G0/1-Zellzyklusarrest heraus an der Einleitung der terminalen Differenzierung in die Trophoblast-Riesenzellen beteiligt sind, wurde untersucht, ob eine Zunahme an polyploiden Zellen durch Behandlung mit CCN1 und CCN3 auftritt, dieser Parameter kann ebenfalls der durchflusszytometrischen Analyse des DNA-Gesamtgehalts entnommen werden. Von der terminalen Differenzierung muriner Trophoblast-Riesenzellen weiß man, dass diese durch Endoreduplikation gekennzeichnet ist (MacAuley et al. 1998). Eine Zunahme der polyploiden SGHPL-5 Zellen ($n > 4$) durch CCN1 und CCN3 war jedoch nicht zu verzeichnen (siehe **Abb. 13B**).

A Zellzyklusphasenverteilung



B Polyploidie

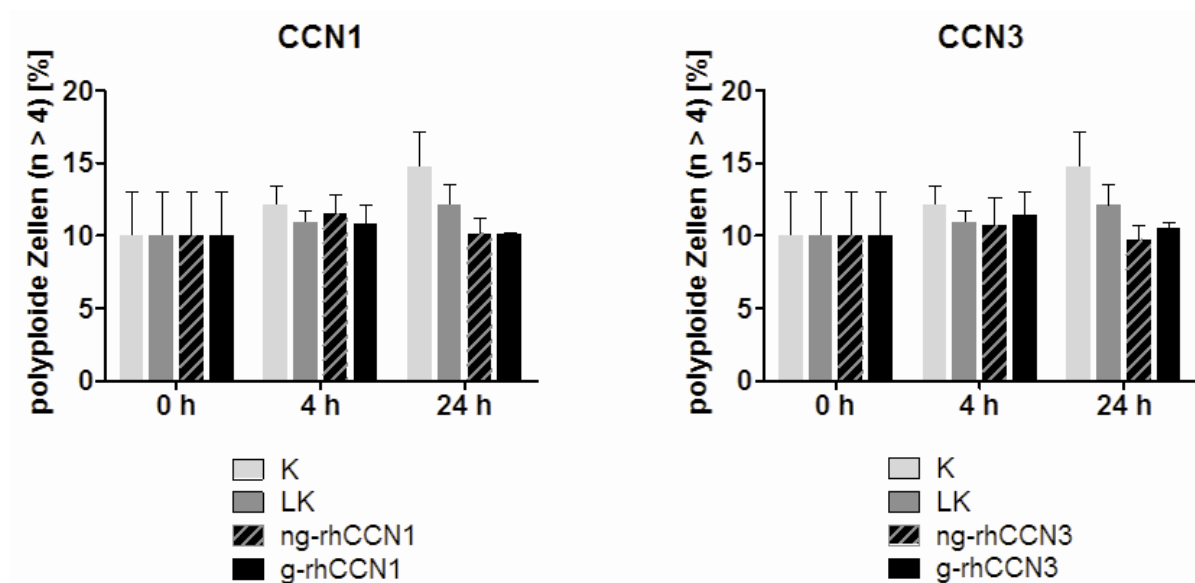


Abb. 13: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die Zellzyklusphasenverteilung und die Polyploidie der SGHPL-5 Zellen

(A) Die Analyse der Zellzyklusphasenverteilung zeigt einen Arrest in der G0/1-Phase des Zellzyklus der SGHPL-5 Zellen durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3. Der Anteil der Zellen in G0/G1 ist im Vergleich zu den Kontrollen nach Behandlung mit CCN1 und CCN3 für 24 h signifikant erhöht. ng-rhCCN3 verursacht eine signifikante Abnahme des Anteils der Zellen in der S-Phase. (B) Die Polyploidie der Zellen ist nicht beeinflusst. K = unbehandelte Kontrolle, LK = Lösungsmittelkontrolle; n = 3; (*P ≤ 0.05).

3.2.2 CCN1 und CCN3 aktivieren den Notch1 Rezeptor und die Expression seines Zielgens p21^{Waf1/Cip1}

Es ist bekannt, dass der Notch1 Rezeptor in den Zytotrophoblastzellen der humanen Plazenta exprimiert wird (De Falco et al. 2007) und insbesondere in den Vorläufern der placentaren Zellsäule aufzutreten scheint (Knöfler 2013). Die Aktivierung des Notch1 Rezeptors reguliert als Zielgen den Cyclin/CDK Inhibitor p21^{Waf1/Cip1} (Devgan et al. 2005). Für CCN3 wurde bereits gezeigt, dass durch Bindung an den Notch1 Rezeptor in Myoblasten der Notch Signaltransduktionsweg ausgelöst und die Differenzierung der Myoblasten inhibiert wird (Sakamoto et al. 2002). Es wurde daher die Aktivierung des Notch1 Signalweges und die Expression von p21^{Waf1/Cip1} nach Behandlung mit CCN1 und CCN3 analysiert. Der Notch1 Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Domäne (NECD) und einer intrazellulären Domäne (NICD), die bei Bindung eines Liganden proteolytisch abgespalten wird und so zum Zellkern gelangt und dort die Expression von Notch-abhängigen Genen regulieren kann. Im Falle der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 konnte eine signifikant erhöhte proteolytische Abspaltung der intrazellulären Notch1-Domäne (cleaved Notch1) durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 und die glykosylierte Form von CCN3 nachgewiesen werden (siehe **Abb. 14A**). Die Expression des Notch1 Zielgens p21^{Waf1/Cip1} wurde durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) und zur Lösungsmittelkontrolle (LK) signifikant hochreguliert. Eine Tendenz zur Steigerung der p21^{Waf1/Cip1} Expression war ebenfalls durch beide Glykosylierungsformen von CCN3 erkennbar (siehe **Abb. 14B**).

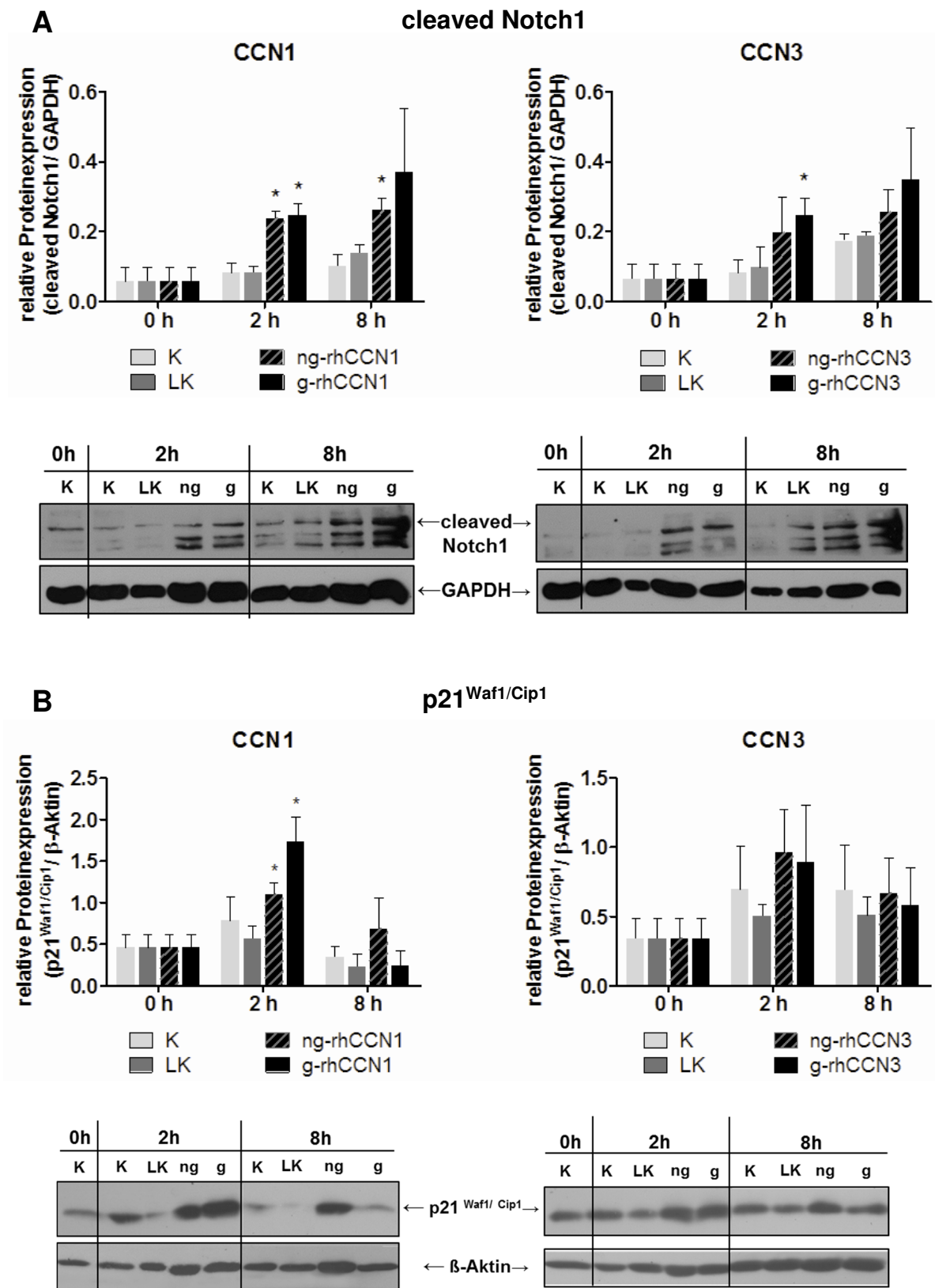


Abb. 14: CCN1 und CCN3 fördern die Aktivierung des Notch1 Rezeptor und die Hochregulierung von p21^{Waf1/Cip1}

(A) CCN1 und CCN3 fördern die Aktivierung des Notch1 Rezeptors und die damit verbundene Aktivierung des Notch1 Signalweges. (B) Die Expression des Notch1 Zielgens und Zellzyklusregulators p21^{Waf1/Cip1} wird durch CCN1 und CCN3 erhöht. Dargestellt sind die densitometrische Auswertung (n = 3) und jeweils ein exemplarischer Western Blot. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; (n = 3); (*P ≤ 0,05).

Um zu bestätigen, dass die Hochregulierung von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ durch CCN1 und CCN3 tatsächlich durch den Notch1-Rezeptor vermittelt wird, wurde dessen Aktivierung durch proteolytische Spaltung mittels des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT bei gleichzeitiger Behandlung mit g-rhCCN1 oder g-rhCCN3 inhibiert. Bei achtstündiger Inkubation mit 10 μM DAPT und gleichzeitiger Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ g-rhCCN1 oder g-rhCCN3 konnte eine verminderte Hochregulierung von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ nachgewiesen werden (siehe **Abb. 15A**). Da die Inhibierung der proteolytischen Spaltung des Notch1-Rezeptors durch DAPT jedoch in den SGHPL-5 Zellen in weiteren Versuchen nicht zuverlässig wiederholt werden konnte, war es nicht möglich eine statistische Auswertung vorzunehmen. Weitere Konzentrationen und Inkubationszeiten des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT wurden getestet (siehe **Abb. 16C**), jedoch zeigte sich auch hier nicht immer eine zuverlässige inhibierende Wirkung, sodass sich in der statistischen Auswertung nur im Fall von g-rhCCN1 eine tendenzielle, aber nicht signifikante Verminderung der Notch1-abhängigen Hochregulierung von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ nachweisen ließ (siehe **Abb. 16A**).

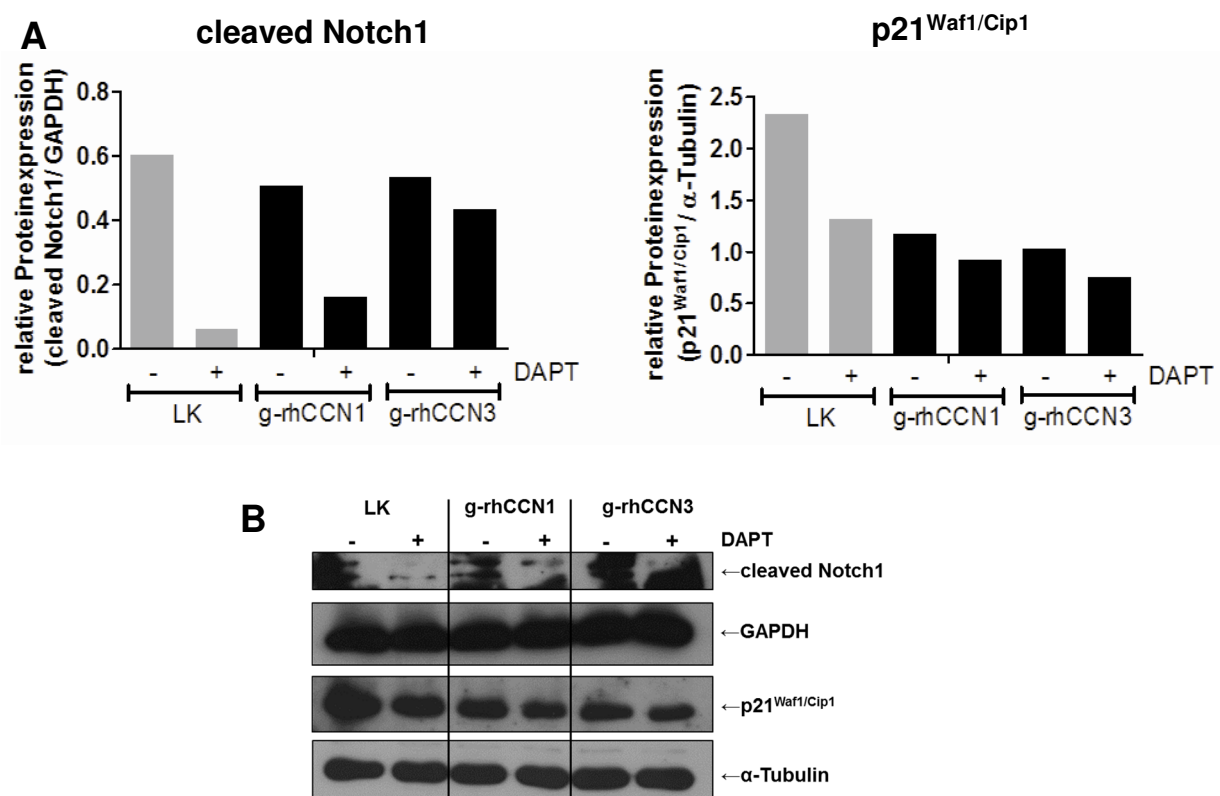


Abb. 15: Auswirkung einer achtstündigen γ -Sekretase-Inhibierung durch 10 μM DAPT auf die Notch1-abhängige $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ -Regulation in SGHPL-5 Zellen.

(A) Nach achtstündiger Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ g-rhCCN1 oder g-rhCCN3 und gleichzeitiger achtstündiger Inhibierung mit 10 μM DAPT zeichnet sich ein deutliche verminderte proteolytische Spaltung des Notch1 Rezeptors, auch die Hochregulierung von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ durch g-rhCCN1 und g-rhCCN3 ist entsprechend vermindert. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung (n=1) und der (B) zugehörige Western Blot; LK = Lösungsmittelkontrolle.

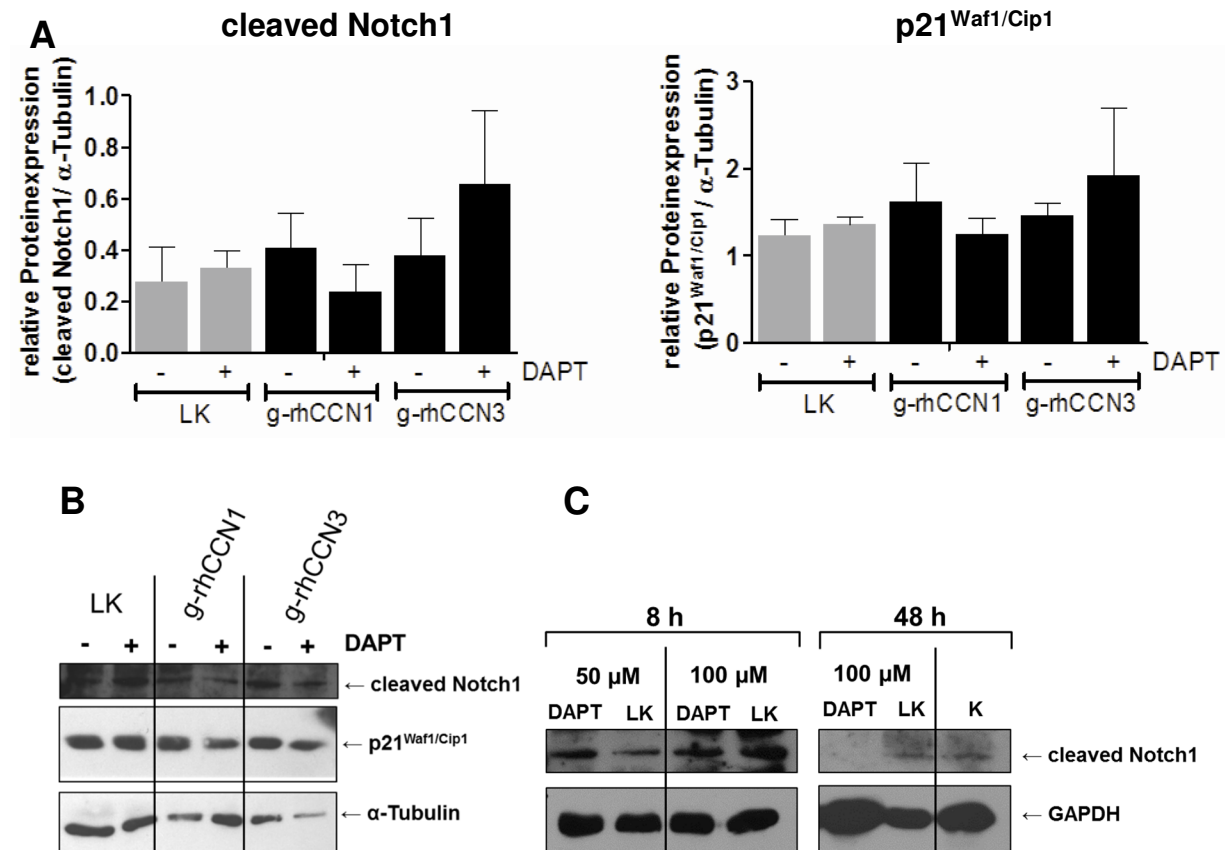


Abb. 16: Auswirkung einer 48-stündigen γ -Sekretase-Inhibierung durch 100 μ M DAPT auf die Notch1-abhängige p21^{Waf1/Cip1}-Regulation in SGHPL-5 Zellen.

(A) Nach achtstündiger Behandlung mit 1 μ g/ml g-rhCCN1 oder g-rhCCN3 und insgesamt 48-stündiger Inhibierung mit 100 μ M DAPT zeichnet sich eine tendenziell verminderte proteolytische Spaltung des Notch1 Rezeptors durch g-rhCCN1 ab, auch die Hochregulierung von p21^{Waf1/Cip1} durch g-rhCCN1 ist tendenziell vermindert. Dargestellt sind die densitometrische Auswertung ($n = 3$) und (B) ein exemplarischer Western Blot; LK = Lösungsmittelkontrolle. (C) Testreihe verschiedener DAPT-Konzentration mit unterschiedlichen Inkubationszeitspannen in SGHPL-5; K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle.

3.2.3 Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Expression von Zellzyklusregulatoren

Um neben p21^{Waf1/Cip1} die Beteiligung weiterer Zellzyklusregulatoren an dem durch CCN1 und CCN3 vermittelten G0/1-Zellzyklusarrest (siehe **Abb. 13A**) genauer zu untersuchen, wurde als nächstes die Expression von Zellzyklusinhibitoren der INK4-Familie (p15^{INK4B} und p16^{INK4A}) und der Cip/Kip-Familie (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}) in Abhängigkeit von CCN1 und CCN3 untersucht. CCN1 und CCN3 hatten keinen Effekt auf die mRNA Expression der Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren p27^{Kip1} und p57^{Kip2} (siehe **Abb. 17C und D**). CCN1 bewirkt eine leichte, tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung des mRNA Expressionslevels von

p16^{INK4A} nach 4 h (siehe *Abb. 17B*), während CCN3 eine leichte, tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung der mRNA Expression von p15^{INK4B} nach 2 h bewirkt (siehe *Abb. 17A*).

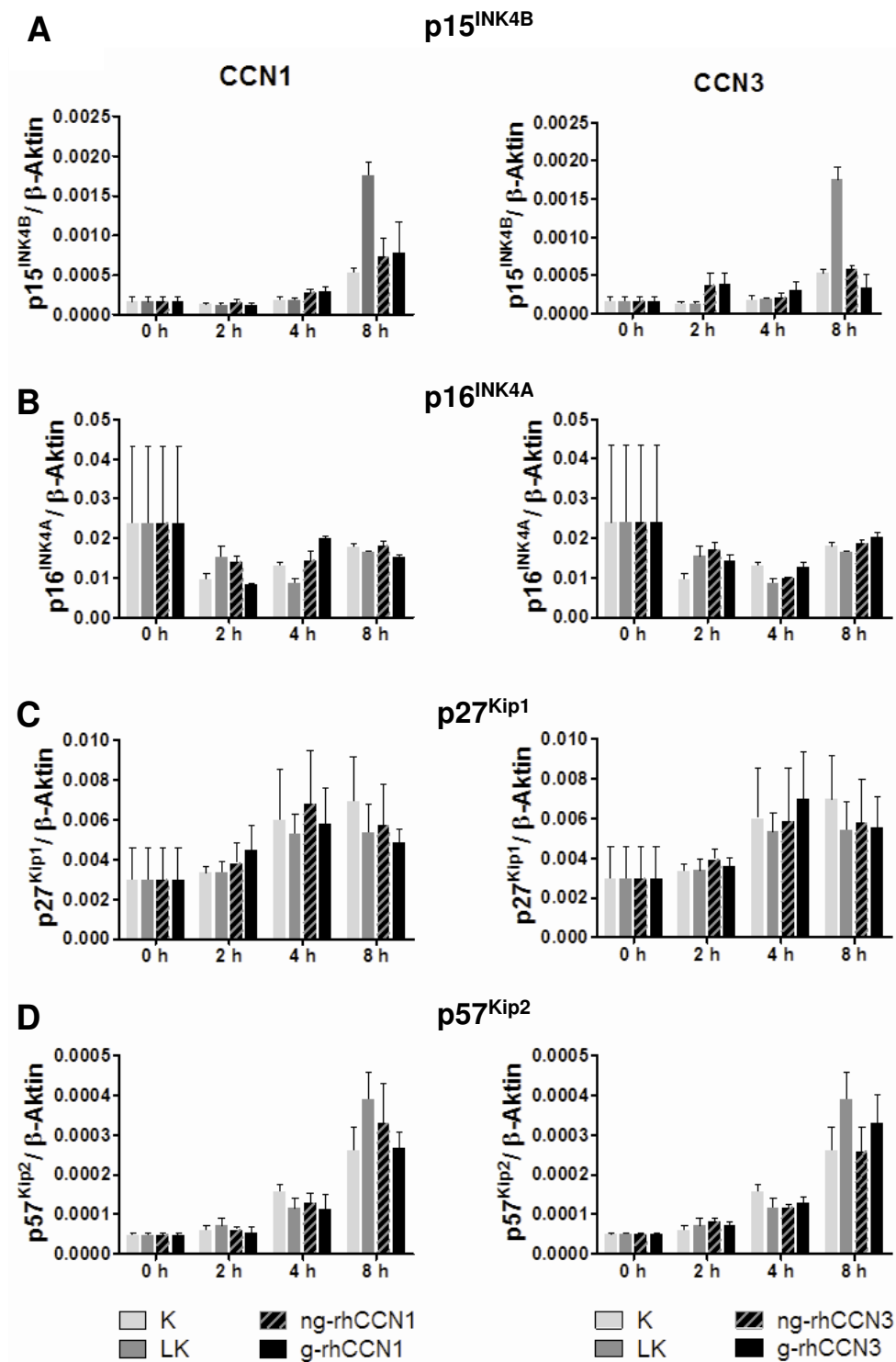


Abb. 17: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die mRNA Expression der Zellzyklusregulatoren p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}

Relative mRNA Expression der Zellzyklusregulatoren (A) p15^{INK4B}, (B) p16^{INK4A}, (C) p27^{Kip1} und (D) p57^{Kip2} im Abgleich zu β-Aktin. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; n = 3.

Die Auswirkungen von CCN1 und CCN3 auf die Expression der Zellzyklusregulatoren $p27^{Kip1}$ (siehe **Abb. 18**) und $p57^{Kip2}$ (siehe **Abb. 19**) wurde auch auf dem Proteinlevel untersucht. Nur die glykosylierte Form von CCN1 (g-rhCCN1) bewirkte eine signifikante Verminderung des Proteinexpressionslevels von $p27^{Kip1}$ nach 8 h (siehe **Abb. 18**), während im Fall von $p57^{Kip2}$ ähnlich wie auf dem mRNA Level auch auf Proteinebene keine Veränderungen im Expressionslevel durch Behandlung mit CCN1 oder CCN3 zu verzeichnen waren (siehe **Abb. 19**). Die Proteinexpression von $p15^{INK4B}$ wurde nicht untersucht, da das Expressionslevel unter der Detektionsgrenze des Western Blots lag (Daten nicht gezeigt). Auf die Proteinexpression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors $p16^{INK4A}$ wird später im Zusammenhang mit der Seneszenz eingegangen (siehe Abschnitt 3.2.4).

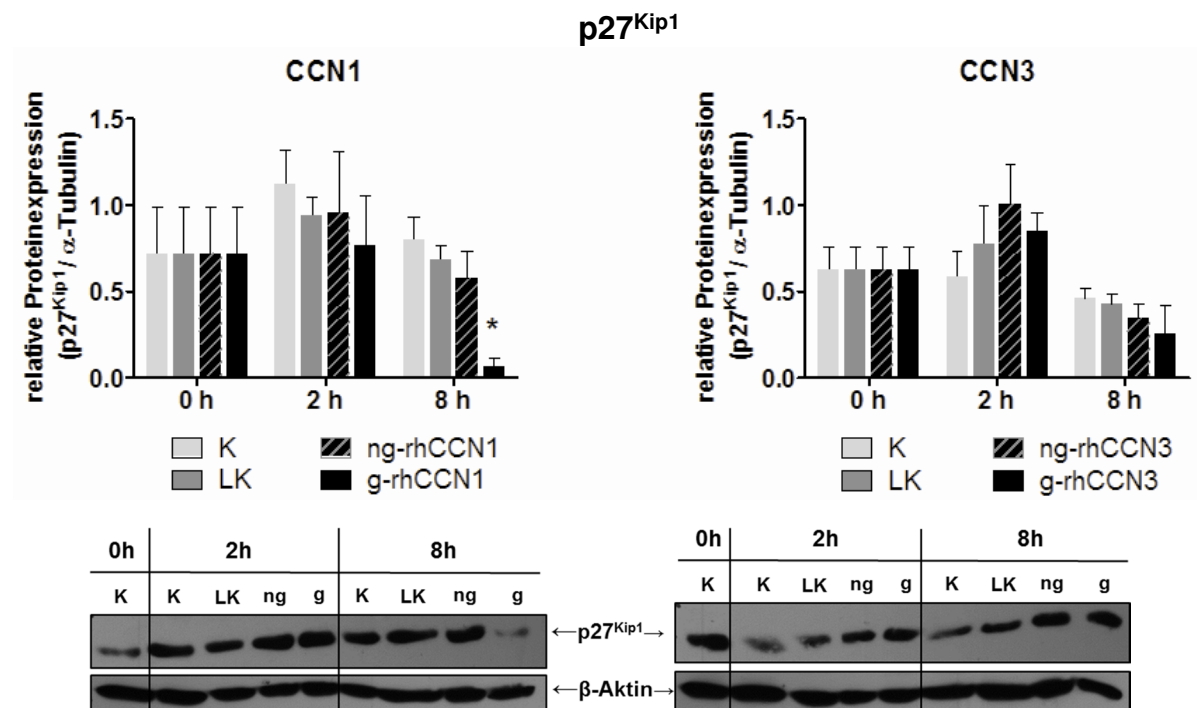


Abb. 18: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die Proteinexpression von $p27^{Kip1}$ nach 2 h und 8 h

Relative Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren $p27^{Kip1}$ im Abgleich zu α -Tubulin. Dargestellt sind die densitometrische Auswertung ($n = 3$) und jeweils ein exemplarischer Western Blot. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; ($n = 3$).

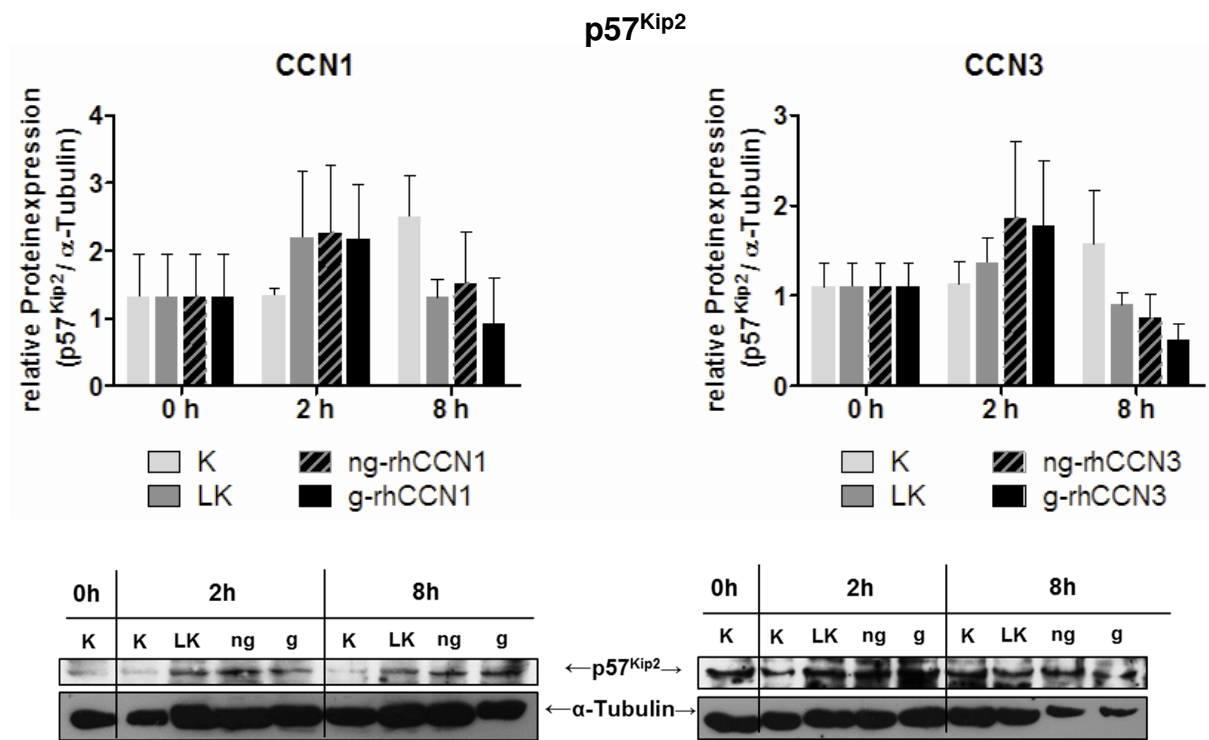


Abb. 19: Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die Proteinexpression von p57^{Kip2} nach 2 h und 8 h

Relative Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren p57^{Kip2} im Abgleich zu α -Tubulin. Dargestellt sind die densitometrische Auswertung (n = 3) und jeweils ein exemplarischer Western Blot. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; (n = 3).

Da in Abhängigkeit von CCN1 und CCN3 in SGHPL-5 Zellen eine G0/1-Zellzyklusarrest festgestellt wurde (siehe **Abb. 13**), wurde neben der Expression der Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p15^{INK4A}, p16^{INK4B}, p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} auch die Expression von Cyclin 1 selbst untersucht. Cyclin D1 ist ein positiver Zellzyklusregulator für den Übergang einer Zelle von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus, der durch ansteigende Konzentrationen während der G1-Phase gekennzeichnet ist (Pines 1999). Daher würde man einen Abfall des Proteinexpressionslevels während eines G0/1-Zellzyklusarrests erwarten. Überraschenderweise konnte, trotz des in **Abb. 13A** beschriebenen G0/1-Zellzyklusarrests, nach Behandlung mit beiden Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 ein tendenziell, aber nicht signifikant erhöhtes Proteinexpressionslevel von Cyclin D1 nach achtstündiger Behandlung mit beiden Glykosylierungsformen von CCN1 (ng-rhCCN1 und g-rhCCN1) sowie nach zweistündiger Behandlung mit beiden Glykosylierungsformen von CCN3 (ng-rhCCN3 und g-rhCCN3) beobachtet werden (siehe **Abb. 20A**), während der Phosphorylierungsstatus des Retinoblastoma Proteins (Rb) im untersuchten Zeitrahmen zunächst unverändert blieb (siehe **Abb. 20B**). Der aktive Cyclin D - CDK4/6 Komplex sorgt normalerweise für die Hyperphosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb), dessen hypophosphorylierte Form

bindet verschiedene andere Proteinfaktoren, die durch die Phosphorylierung von Rb freigegeben werden (Kato et al. 1993; Weinberg 1995).

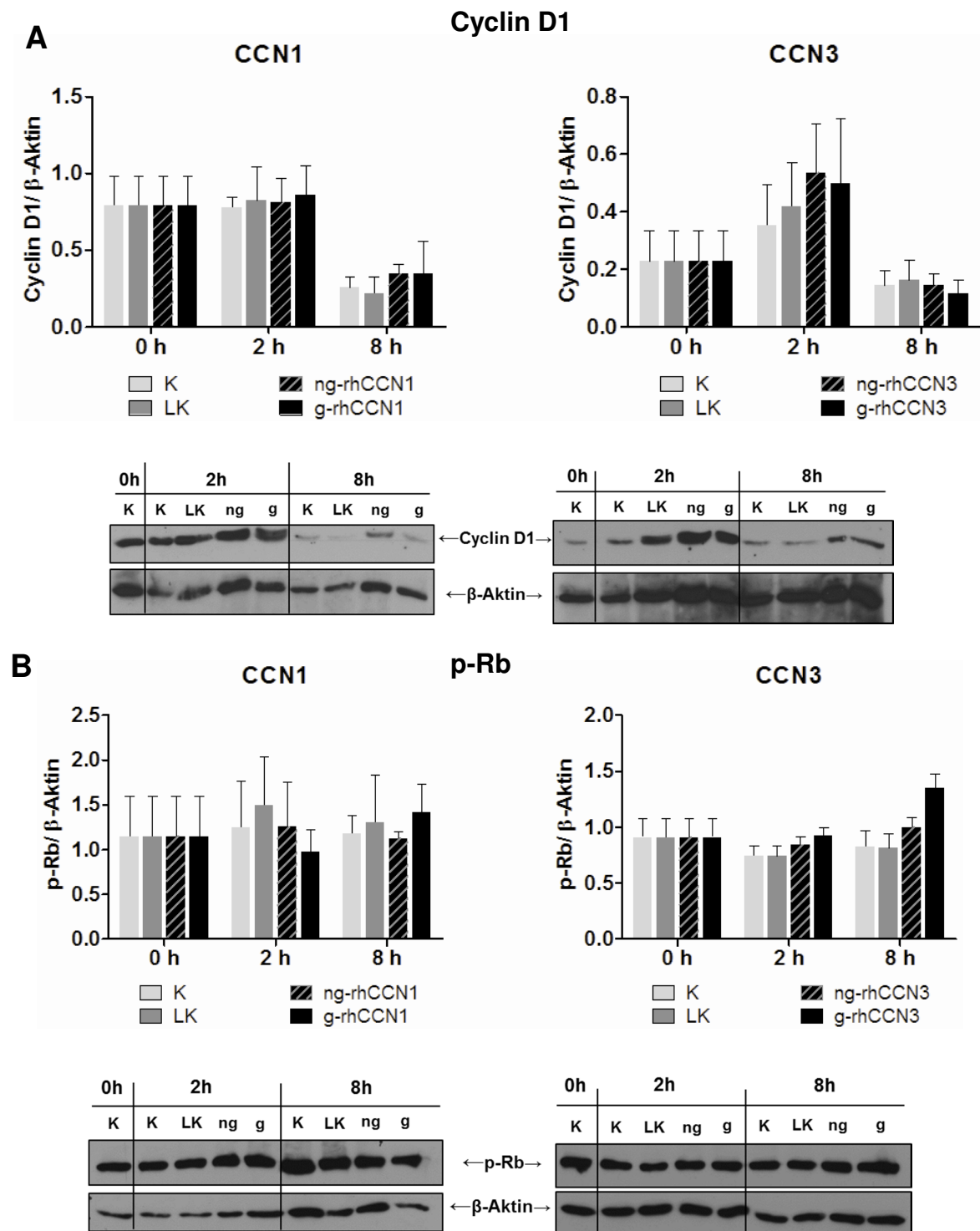


Abb. 20: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf das Proteinexpressionslevel von Cyclin D1 und phosphoryliertem Retinoblastoma Protein in SGHPL-5 nach 2 h und 8 h

Relative Proteinexpression von (A) Cyclin D1 und (B) phosphoryliertem Retinoblastoma Protein in SGHPL-5 Zellen. Dargestellt sind die densitometrische Auswertung (n = 3) und jeweils ein exemplarischer Western Blot. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; (n = 3).

3.2.4 Einfluss von CCN1 und CCN3 auf die zelluläre Seneszenz

CCN1 und CCN3 reduzieren die Proliferation von SGHPL-5 Zellen über einen G0/1-Zellzyklusarrest (siehe **Abb. 10** und **Abb. 13**), aber die verschiedenen Zellzyklusregulatoren der INK4-Familie (p15^{INK4B}, p16^{INK4A}) und der Cip/Kip-Familie (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}) und zeigen auf mRNA-Ebene nur im Fall von p15^{INK4B} und p16^{INK4A} eine tendenziell leicht erhöhte Expression (siehe **Abb. 17**). Auf Proteinebene konnte für p27^{Kip1} und p57^{Kip2} kein Anstieg des Expressionslevels beobachtet werden (siehe **Abb. 18** und **Abb. 19**) und p15^{INK4B} konnte auf Proteinebene nicht untersucht werden. Hervorgehoben werden kann jedoch die signifikant erhöhte Expression von p21^{Waf1/Cip1}, die positiv mit der Aktivierung des Notch1-Rezeptors korrelierte (siehe **Abb. 14**). Diese simultane Hochregulierung von p21^{Waf1/Cip1} und Cyclin D1 erscheint zunächst im Zusammenhang mit einem Zellzyklusarrest ungewöhnlich, jedoch ist eine verminderte Proliferationsrate nicht notwendigerweise mit einem Abfall des Cyclin D1 Expressionslevels verbunden (Ullmannova et al. 2003). Die gleichzeitige Hochregulierung von p21^{Waf1/Cip1} und Cyclin D1 kann in seneszenten Zellen auftreten (Alt et al. 2002; Coleman et al. 2003). Um dem Hinweis auf eine erhöhte Seneszenzrate im Hinblick auf die Wirkung von CCN1 und CCN3 in der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 genauer nachzugehen, wurde eine Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung durchgeführt, um das Auftreten von zellulärer Seneszenz nachzuweisen. Der prozentuale Anteil seneszenten Zellen stieg durch die glykosylierte Form von CCN1 ($5,93 \pm 0,75 \%$) und beide Glykosylierungsformen von CCN3 (ng: $7,3 \pm 1,09 \%$; g: $8,26 \pm 1,44 \%$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($4,35 \pm 0,30 \%$) und der Lösungsmittelkontrolle ($2,96 \pm 0,70 \%$) signifikant an (siehe **Abb. 23**). Durch unglykosyliertes CCN1 ($7,03 \pm 1,5 \%$) konnte eine tendenzielle, aber nicht signifikante Steigerung der Seneszenz beobachtet werden (siehe **Abb. 23**). Als anerkannte Seneszenzmarker gelten p21^{Waf1/Cip1} (Chen 2000) und insbesondere p16^{INK4A} (Krishnamurthy et al. 2004). Neben der gesteigerten Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase Aktivität (siehe **Abb. 23**) konnte eine tendenzielle, aber nicht signifikante Akkumulierung von p21^{Waf1/Cip1} in SGHL-5 Zellen nach Behandlung mit beiden Glykosylierungsformen von CCN1 sowie glykosyliertem CCN3 nach 2 h im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden. Nach 24 h bestätigte sich dies auch für beide Glykosylierungsformen von CCN3 (siehe **C**). Eine signifikante Akkumulierung von p16^{INK4A} zeigte sich nach zweistündiger Behandlung mit beiden Glykosylierungsformen von CCN1, sowie glykosyliertem CCN3 (siehe **Abb. 21D** und **Abb. 22**). Unglykosyliertes CCN3 verursachte eine tendenzielle, aber nicht signifikante Hochregulierung von p16^{INK4A} nach

zweistündiger Behandlung (siehe **Abb. 21D** und **Abb. 22**). Eine tendenzielle, aber nicht signifikante Akkumulierung von Cyclin D1 war nach zweistündiger Behandlung der SGHPL-5 Zellen mit beiden Glykosylierungsformen sowohl von CCN1 als auch CCN3 zu beobachten (siehe **Abb. 21B** und **Abb. 22**), während auch hier nach längerer Behandlung der Phosphorylierungsstatus von Rb unverändert blieb (siehe **Abb. 21A** und **Abb. 22**). Nur durch die Behandlung mit glykosyliertem CCN1 zeigte sich ein geringeres Level an phosphoryliertem Rb (siehe **Abb. 21A** und **Abb. 22**).

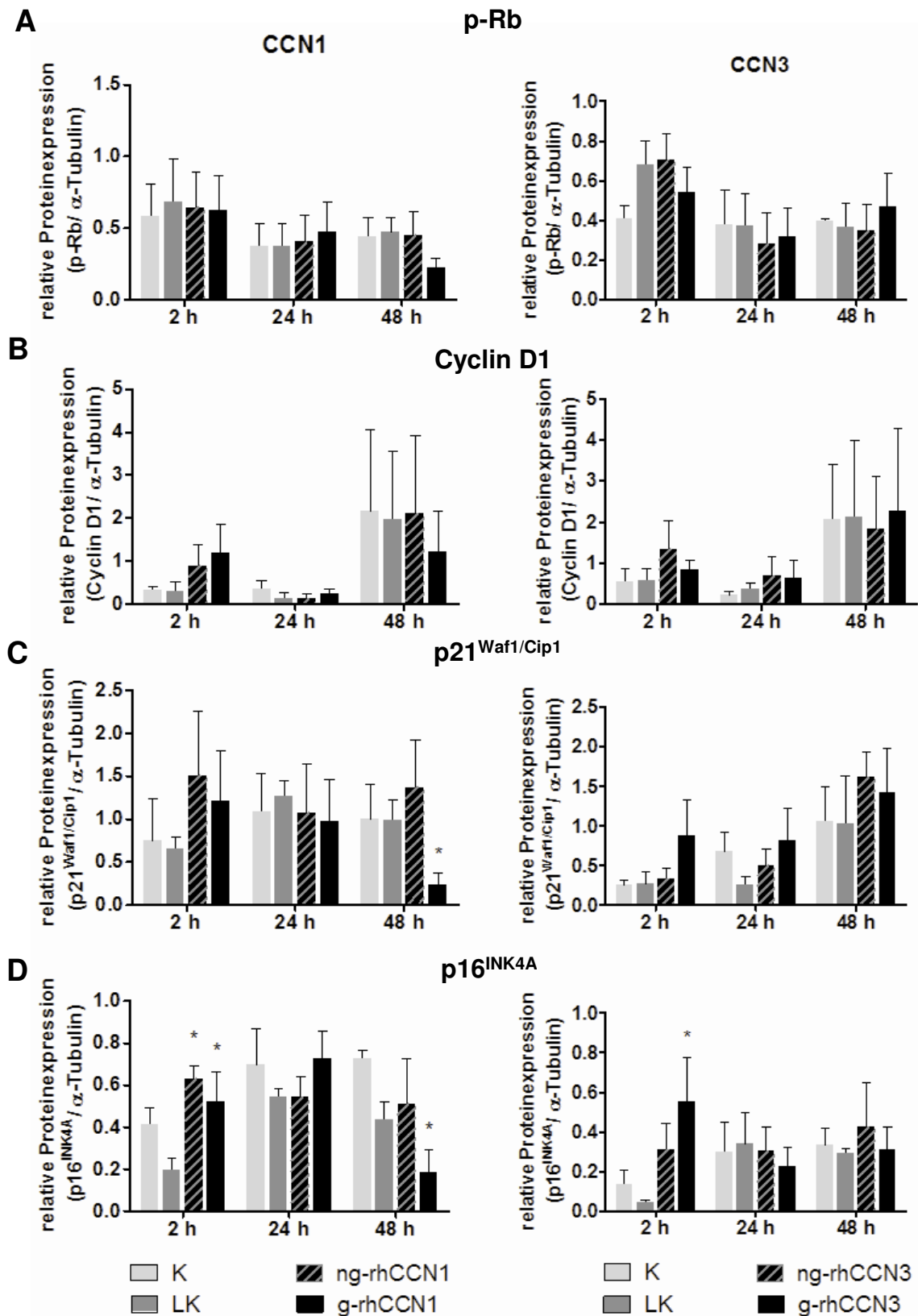


Abb. 21: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Proteinexpression von Cyclin D1, phosphoryliertem Rb, p16^{INK4A} und p21^{Waf1/Cip1} in SGHPL-5 Zellen nach 2 h, 24 h und 48 h

Relative Proteinexpression von (A) phosphoryliertem Retinoblastoma Protein, (B) Cyclin D1, (C) p21^{Waf1/Cip1} und (D) p16^{INK4A} in SGHPL-5 Zellen nach 2 h, 24 h und 48 h Behandlung mit CCN1 und CCN3 (ng-rhCCN1/3 und g-rhCCN1/3). Dargestellt ist die densitometrische Auswertung (n = 3); *P ≤ 0,05. Jeweils ein exemplarischer Western Blot ist in **Abb. 22** dargestellt.

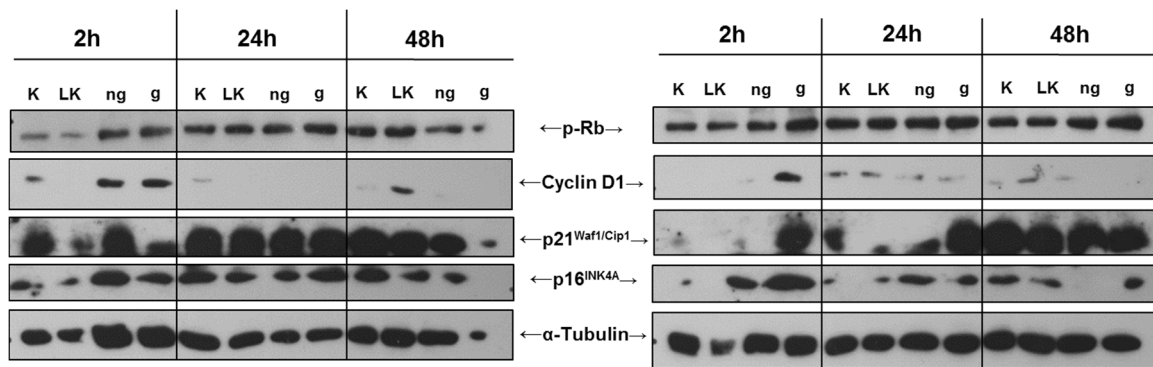


Abb. 22: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Proteinexpression von Cyclin D1, phosphoryliertem Retinoblastoma Protein, p16^{INK4A} und p21^{Waf1/Cip1} in SGHPL-5 Zellen nach 2 h, 24 h und 48 h (exemplarischer Western Blot zu Abb. 21)

Dargestellt ist jeweils ein exemplarischer Western Blot zu den densitometrischen Auswertungen aus Abb. 21. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle.

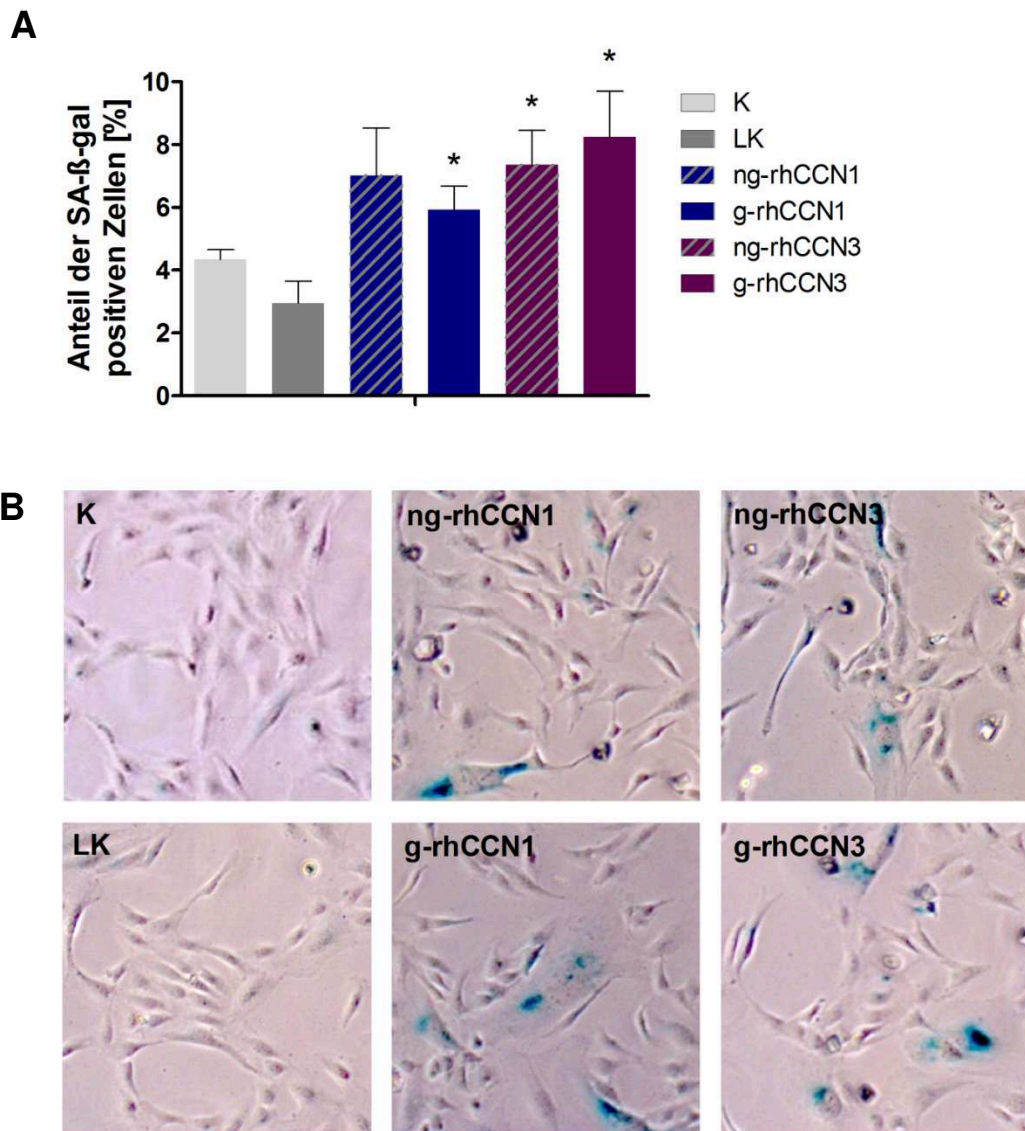


Abb. 23: CCN1 und CCN3 induzieren die Seneszenz in SGHPL-5 Trophoblastzellen

Bestimmung der Seneszenzrate durch SA-β-Gal Färbung nach 48-stündiger Behandlung mit unglykosyliertem CCN1/3 (ng-rhCCN1/3) und glykosyliertem CCN1/3 (g-rhCCN1/3). **(A)** Quantitative Darstellung des Verhältnisses SA-β-Gal positiver Zellen zur Gesamtzellzahl; (n=3); *P ≤ 0,05. **(B)** Exemplarische Darstellung je eines vergrößerten Ausschnitts der mikroskopischen Aufnahmen. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle.

3.3 Migration

3.3.1 CCN1 und CCN3 verstärken das Migrationsverhalten von SGHPL-5 Zellen durch Signalübermittlung über den $\alpha 5 \beta 1$ Integrin Rezeptor

In Jeg3 Zellen werden die Migrations- und Invasionseigenschaften ausschließlich durch die unglykosylierte Form durch Interaktion mit dem Integrin $\alpha 5 \beta 1$ und die Aktivierung des Akt und des MAPK-Signalweges verstärkt (Wagener et al. 2013). Neben einer proliferationshemmenden Wirkung von CCN1 und CCN3 konnte eine Steigerung der Migrationskapazität insbesondere durch glykosyliertes CCN1 und CCN3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) und zur Lösungsmittelkontrolle (LK) auch in der benignen, plazentaren Trophoblastzelllinie SGHPL-5 beobachtet werden (siehe **Abb. 24** und **Abb. 25**). Die Signalübermittlung der CCN Proteine zur Regulation der Zellmigration und –invasion wird über Rezeptoren wie Integrine vermittelt (Chen und Lau 2009). Im Fall von CCN3 konnte gezeigt werden, dass das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ in der Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 für die Signalübermittlung von CCN3 verantwortlich ist (Wagener et al. 2013) und die Migration darüber erhöht wird. Um zu überprüfen, ob die Auswirkungen von glykosyliertem CCN1 und CCN3 auf die Migrationseigenschaften auch in der benignen plazentaren Trophoblastzelllinie SGHPL-5 über das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ vermittelt werden, wurde ein siRNA-Knockdown der Integrin $\alpha 5$ - Untereinheit vorgenommen. Im Vergleich zu den Zellen, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA (non-target siRNA) und glykosyliertem CCN1/3 behandelt wurden, zeigte sich bei den Zellen, die mit gegen Integrin $\alpha 5$ gerichteter siRNA (siITGA5) und glykosyliertem CCN1/3 behandelt wurden, eine deutlich verringerte Migrationskapazität nach 24 h. Das Migrationsverhalten war jedoch insgesamt in den Versuchsansätzen, die mit Transfektionsreagenz behandelt wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen leicht verringert (siehe **Abb. 24** und **Abb. 25**).

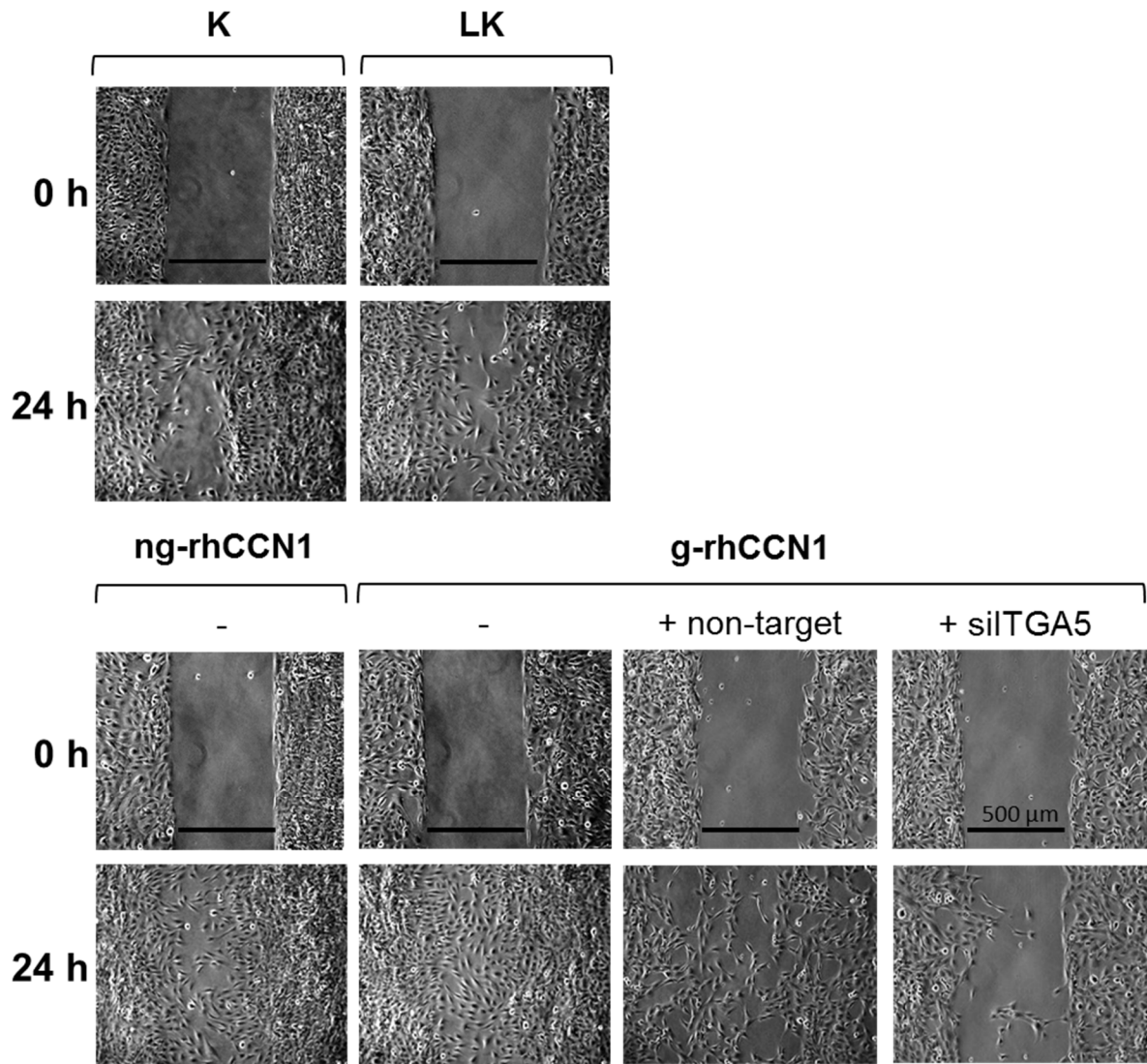


Abb. 24: CCN1 erhöht das Migrationsverhalten von SGHPL-5 Trophoblastzellen über das Integrin $\alpha 5 \beta 1$

Wundheilungsassay nach 24-stündiger Behandlung mit unglykosyliertem CCN1 (ng-rhCCN1) und glykosyliertem CCN1 (g-rhCCN1) im Vergleich zu unbehandelter Kontrolle (K) und Lösungsmittelkontrolle (LK). Glykosyliertes CCN1 wurde zusätzlich mit siRNA gegen Integrin $\alpha 5$ (+ siITGA5) und einer nicht zielgerichteten siRNA (+ non-target) als Kontrolle behandelt. Darstellung je einer exemplarischen Abbildung von drei Versuchen.

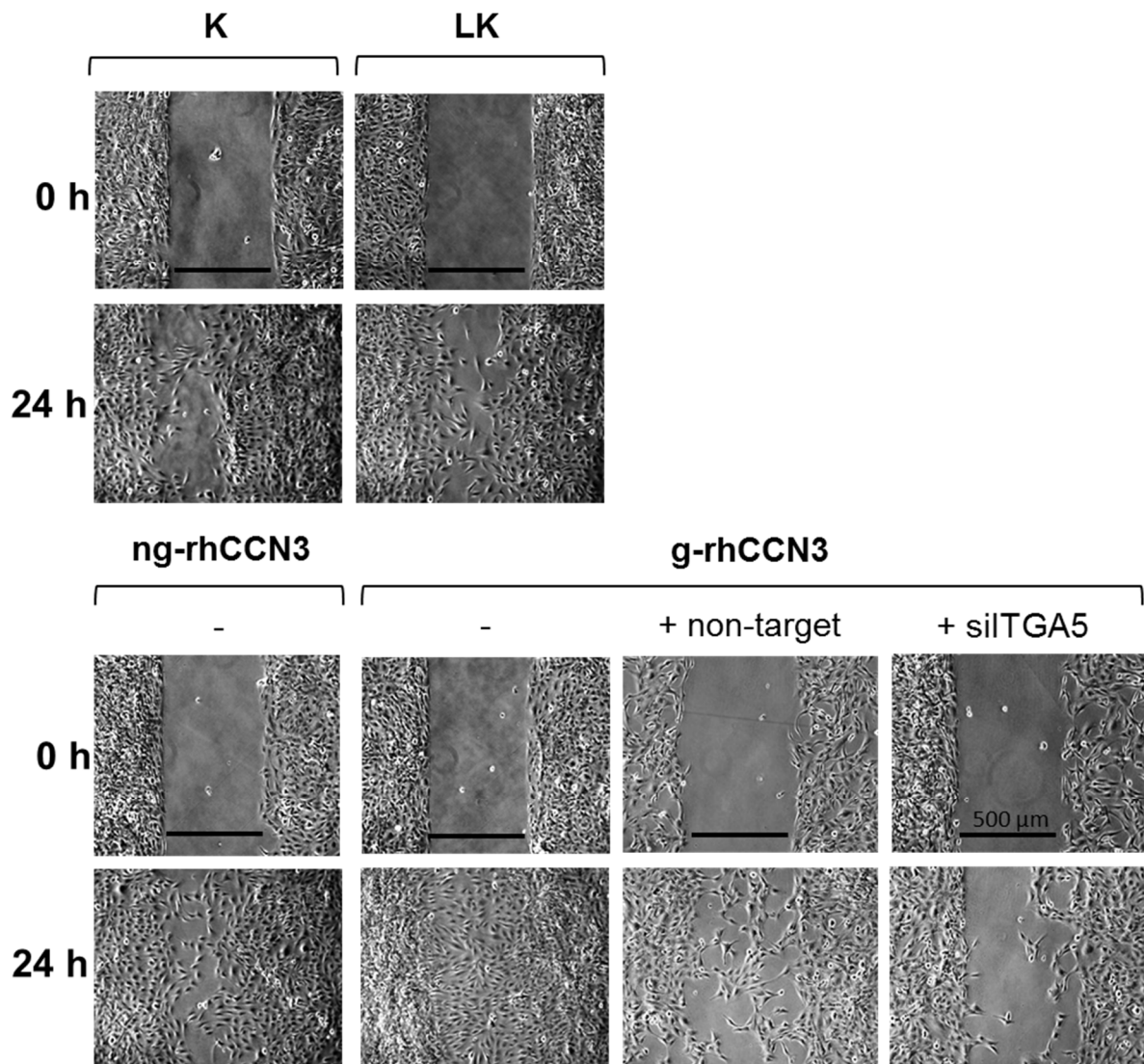


Abb. 25: CCN3 erhöht das Migrationsverhalten von SGHPL-5 Trophoblastzellen über das Integrin $\alpha 5 \beta 1$

Wundheilungsassay nach 24-stündiger Behandlung mit unglykosyliertem CCN3 (ng-rhCCN3) und glykosyliertem CCN3 (g-rhCCN3) im Vergleich zu unbehandelter Kontrolle (K) und Lösungsmittelkontrolle (LK). Glykosyliertes CCN3 wurde zusätzlich mit siRNA gegen Integrin $\alpha 5$ (+ siITGA5) und einer nicht zielgerichteten siRNA (+ non-target) als Kontrolle behandelt. Darstellung je einer exemplarischen Abbildung von drei Versuchen.

3.3.2 Die Signalübermittlung von CCN1 und CCN3 über die Aktivierung von FAK und Akt erfolgt möglicherweise durch Interaktion mit dem Integrin $\alpha 5 \beta 1$

Beide Untereinheiten des Integrins $\alpha 5 \beta 1$ werden in den SGHPL-5 Zellen exprimiert (siehe **Abb. 8B** und **Abb. 26**). Im Falle der Untereinheit Integrin $\beta 1$ waren keine Änderungen im Expressionslevel auf mRNA-Ebene zu beobachten, während im Falle von Integrin $\alpha 5$ eine

tendenzielle, aber nicht signifikante, transiente Steigerung der mRNA Expression nach vierstündiger Behandlung mit beiden Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 auftrat (siehe *Abb. 26*).

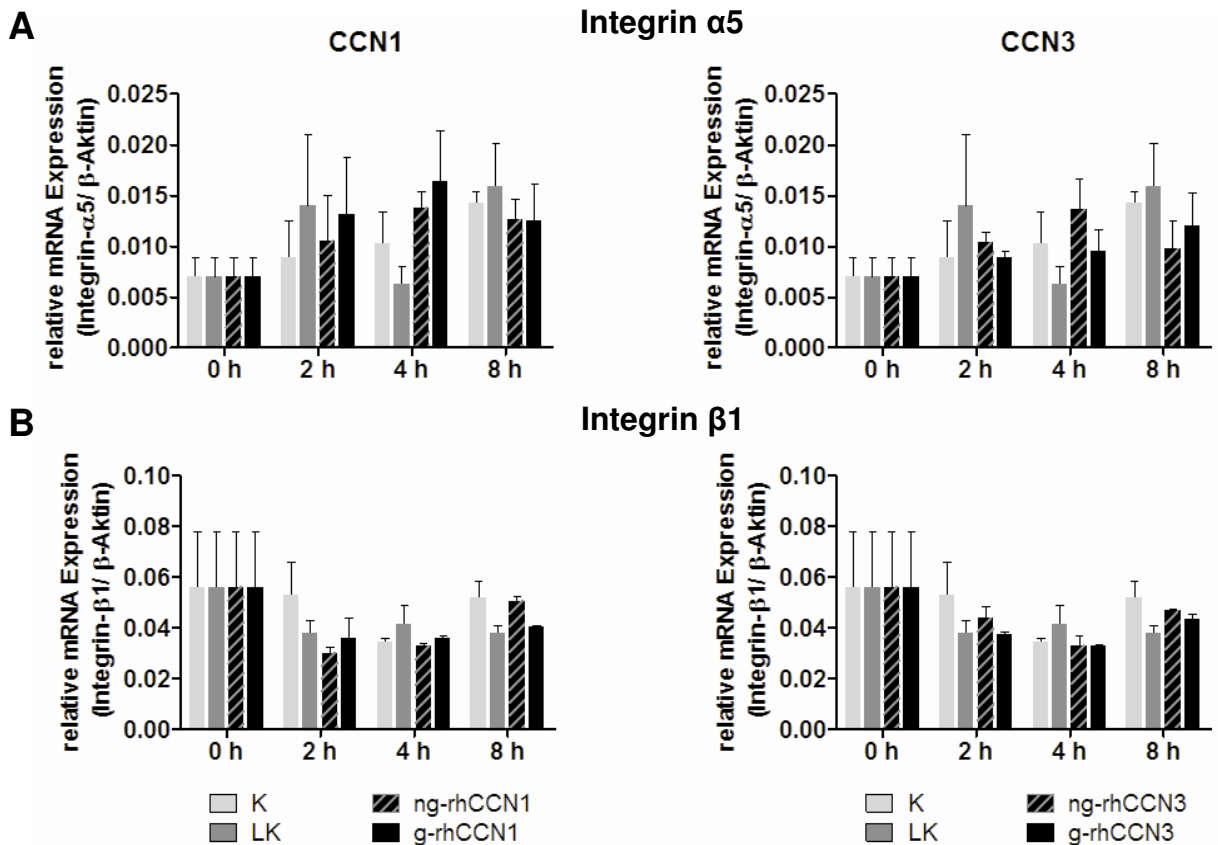


Abb. 26: Relative mRNA Expression der Integrin-Untereinheiten Integrin $\alpha 5$ und Integrin $\beta 1$ in der Trophoblastzelllinie SGHPL-5

Relative mRNA Expression der Integrin-Untereinheiten (A) Integrin $\alpha 5$ (ITGA5) (B) Integrin $\beta 1$ (ITGB1) nach zwei-, vier und achtstündiger Behandlung mit unglykosyliertem CCN1/3 (ng-rhCCN1/3) und glykosyliertem CCN1/3 (g-rhCCN1/3) im Abgleich zu β -Aktin. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; n = 3.

Die Fokale Adhäsionskinase (FAK) ist an Integrin-vermittelten Signaltransduktionswegen der extrazellulären Matrix beteiligt und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferation, Migration und Invasion (Schaller 2010). Im Kontext der CCN-vermittelten Signaltransduktion wird die Aktivierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) durch Phosphorylierung durch glykosyliertes CCN3 (g-rhCCN3) nach achtstündiger Behandlung signifikant gesteigert (siehe *Abb. 27*). Der Phosphorylierungsstatus von FAK wurde aber weder durch glykosyliertes noch unglykosyliertes CCN1 verändert (siehe *Abb. 27*).

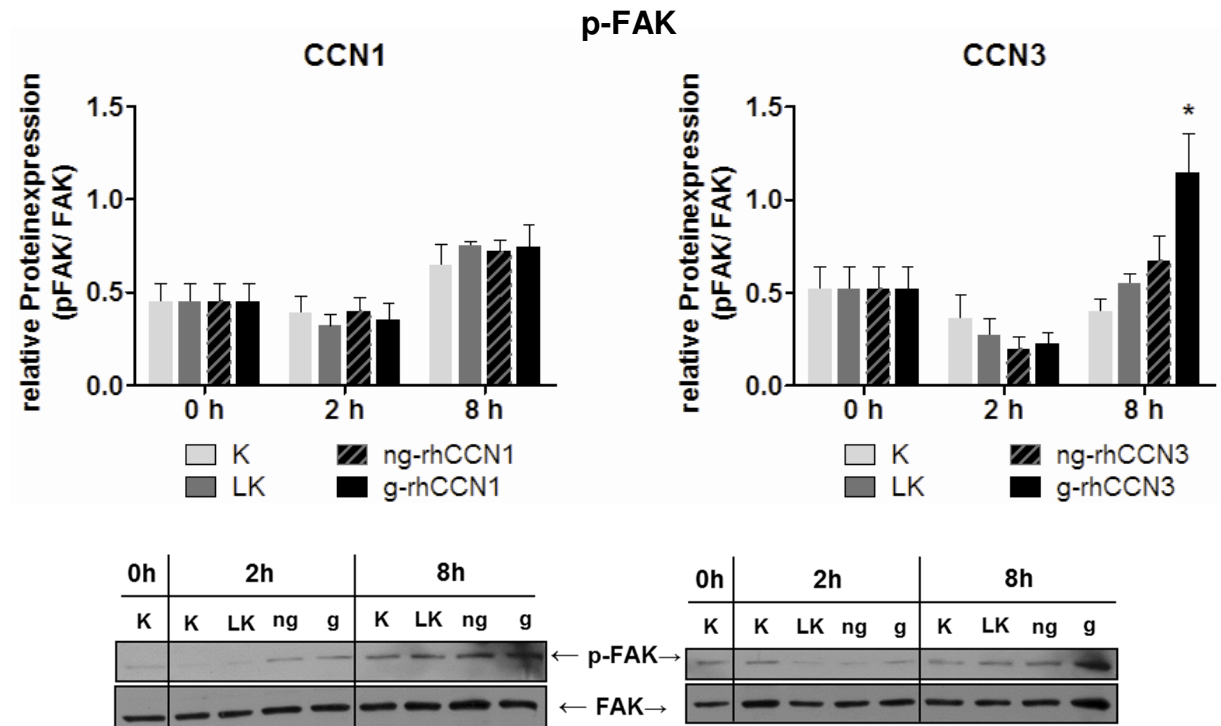


Abb. 27: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Aktivierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK)

Aktivierung von FAK anhand des Phosphorylierungsstatus nach zwei- und achtstündiger Behandlung mit unglykosyliertem CCN1/3 (ng-rhCCN1/3) und glykosyliertem CCN1/3 (g-rhCCN1/3). Darstellung des Verhältnisses der durch Phosphorylierung aktivierten Form (p-FAK) zur Expression der unphosphorylierten inaktiven Form (FAK) nach der densitometrischen Auswertung und je eines exemplarischen Western Blots. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; n = 3; *P ≤ 0,05.

Die Phosphorylierung von Akt wurde jedoch in den SGHPL-5 Zellen durch glykosyliertes CCN1 nach zweistündiger Behandlung und durch unglykosyliertes CCN1 nach achtstündiger Behandlung signifikant gesteigert. Die glykosylierte Form von CCN1 verursachte nach achtstündiger Behandlung eine tendenzielle, aber nicht signifikante Verstärkung der Phosphorylierung in SGHPL-5 Zellen (siehe **Abb. 28**). Die glykosylierte Form von CCN3 bewirkte in SGHPL-5 Zellen nach zweistündiger Behandlung mit glykosyliertem CCN3 eine tendenzielle, aber nicht signifikante Verstärkung der Phosphorylierung von Akt und nach achtstündiger Behandlung eine signifikante Verstärkung (siehe **Abb. 28**).

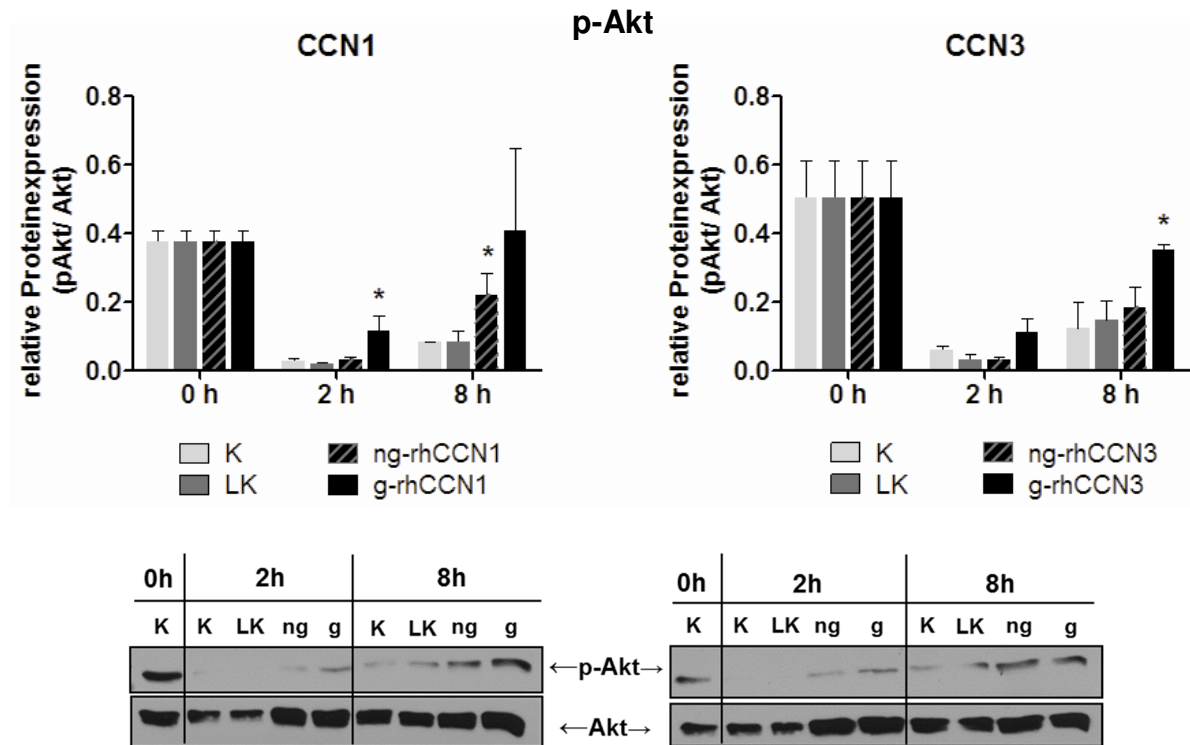


Abb. 28: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Aktivierung der P13K/ Akt Kinase

Aktivierung von Akt anhand des Phosphorylierungsstatus nach zwei- und achtstündiger Behandlung mit unglykosyliertem CCN1/3 (ng-rhCCN1/3) und glykosyliertem CCN1/3 (g-rhCCN1/3). Darstellung des Verhältnisses der durch Phosphorylierung aktivierten Form (p-Akt) zur Expression der unphosphorylierten inaktiven Form (Akt) nach der densitometrischen Auswertung und je eines exemplarischen Western Blots. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; n = 3; *P ≤ 0,05.

Ein anderer wichtiger Aspekt der Zellmigration ist die FAK/ Akt-vermittelte Sekretion von MMP-2 und MMP-9 (Chung et al. 2004; Cheng et al. 2006; Park et al. 2006; Chen et al. 2010). Während die mRNA Expression der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) in der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 durch Behandlung mit CCN1 und CCN3 nicht verändert wurde (siehe **Abb. 29A**), erhöhten glykosyliertes CCN1 und CCN3 das mRNA Expressionslevel der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) in den SGHPL-5 Zellen signifikant (siehe **Abb. 29B**). Diese Erhöhung erfolgte transient nach vierstündiger Behandlung mit CCN1 und nach zweistündiger Behandlung mit CCN3 (siehe **Abb. 29B**).

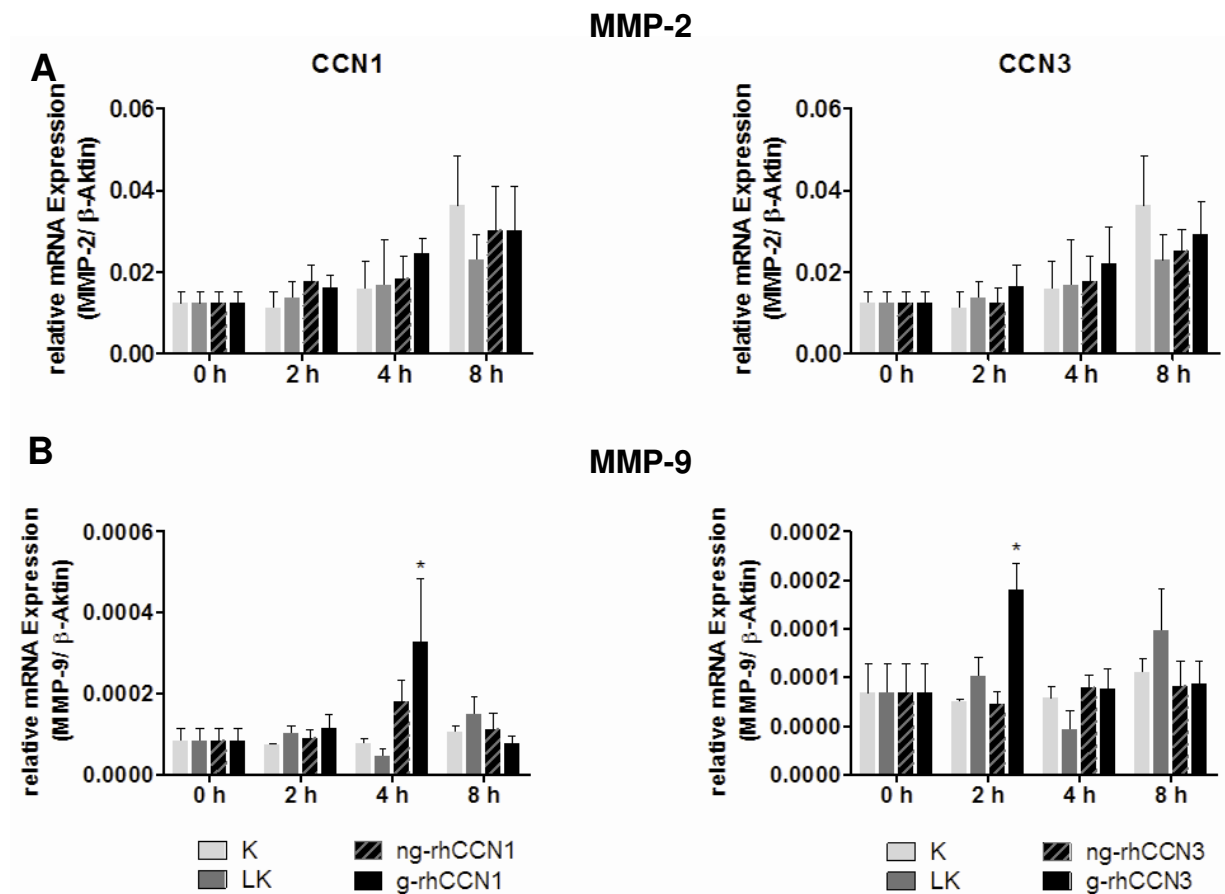


Abb. 29: Relative mRNA Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 in SGHPL-5 Trophoblastzellen

Relative mRNA Expression der Matrixmetalloproteinasen (A) MMP-2 und (B) MMP-9 nach zwei-, vier- und achtstündiger Behandlung mit unglykosyliertem CCN1/3 (ng-rhCCN1/3) und glykosyliertem CCN1/3 (g-rhCCN1/3) im Abgleich zu β -Aktin. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; n = 3; *P \leq 0,05.

Die Phosphorylierung von ERK 1/2 scheint in der CCN-vermittelten Regulation der Migrationskapazität von SGHPL-5 Trophoblastzellen keine Rolle zu spielen, da die Phosphorylierungsstatus von ERK 1/2 durch Behandlung mit CCN1 und CCN3 nicht verändert wird (siehe *Abb. 30*).

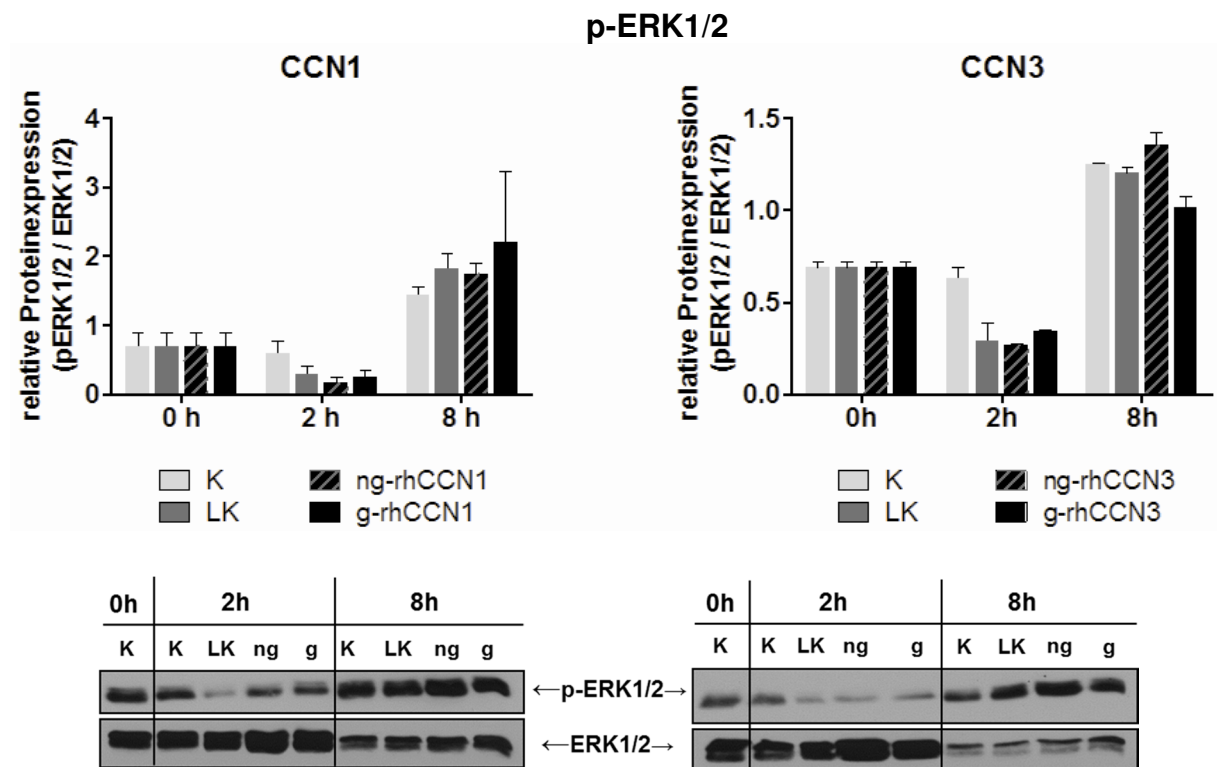


Abb. 30: Auswirkung von CCN1 und CCN3 auf die Aktivierung der ERK 1/2 MAP Kinasen

Aktivierung von Akt anhand des Phosphorylierungsstatus nach 2 und 8 stündiger Behandlung mit unglykosyliertem CCN1/3 (ng-rhCCN1/3) und glykosyliertem CCN1/3 (g-rhCCN1/3). Darstellung des Verhältnisses der durch Phosphorylierung aktivierten Form (p-ERK 1/2) zur Expression der unphosphorylierten inaktiven Form (ERK 1/2) nach der densitometrischen Auswertung und je eines exemplarischen Western Blots. K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; n = 3.

Um die in *Abb. 24* und *Abb. 25* gezeigte Beteiligung des Integrins $\alpha 5 \beta 1$ an der Signalübermittlung von CCN1 und CCN3 zur Regulation der Migrationskapazität in SGHPL-5 Trophoblastzellen auf der Ebene der Aktivierung von FAK und Akt zu bestätigen, wurde auch hier ein siRNA-Knockdown der Integrin $\alpha 5$ Untereinheit vorgenommen. Ein signifikanter Knockdown von Integrin $\alpha 5$ konnte durch eine 48-stündige Behandlung mit der siRNA gegen Integrin $\alpha 5$ erreicht werden (siehe *Abb. 31A*). Die densitometrische Auswertung der Western Blots von phosphoryliertem FAK und phosphoryliertem Akt zeigt nicht das erwartete Ausbleiben der Phosphorylierung von FAK und Akt durch Behandlung mit CCN1 und CCN3 unter Integrin $\alpha 5$ Knockdown-Bedingungen (siehe *Abb. 31B*). Allerdings sind entgegen den Erwartungen auch keine Aktivierung von FAK oder Akt durch Phosphorylierung mehr in den Kontrollen mit unspezifischer siRNA zu erkennen, da wie im exemplarischen Einzelblot in *Abb. 31B* zu erkennen ist, auch Menge der unphosphorylierten FAK und Akt reguliert ist, so dass sich durch den Abgleich der Effekt in der statistischen Auswertung wieder ausgleicht.

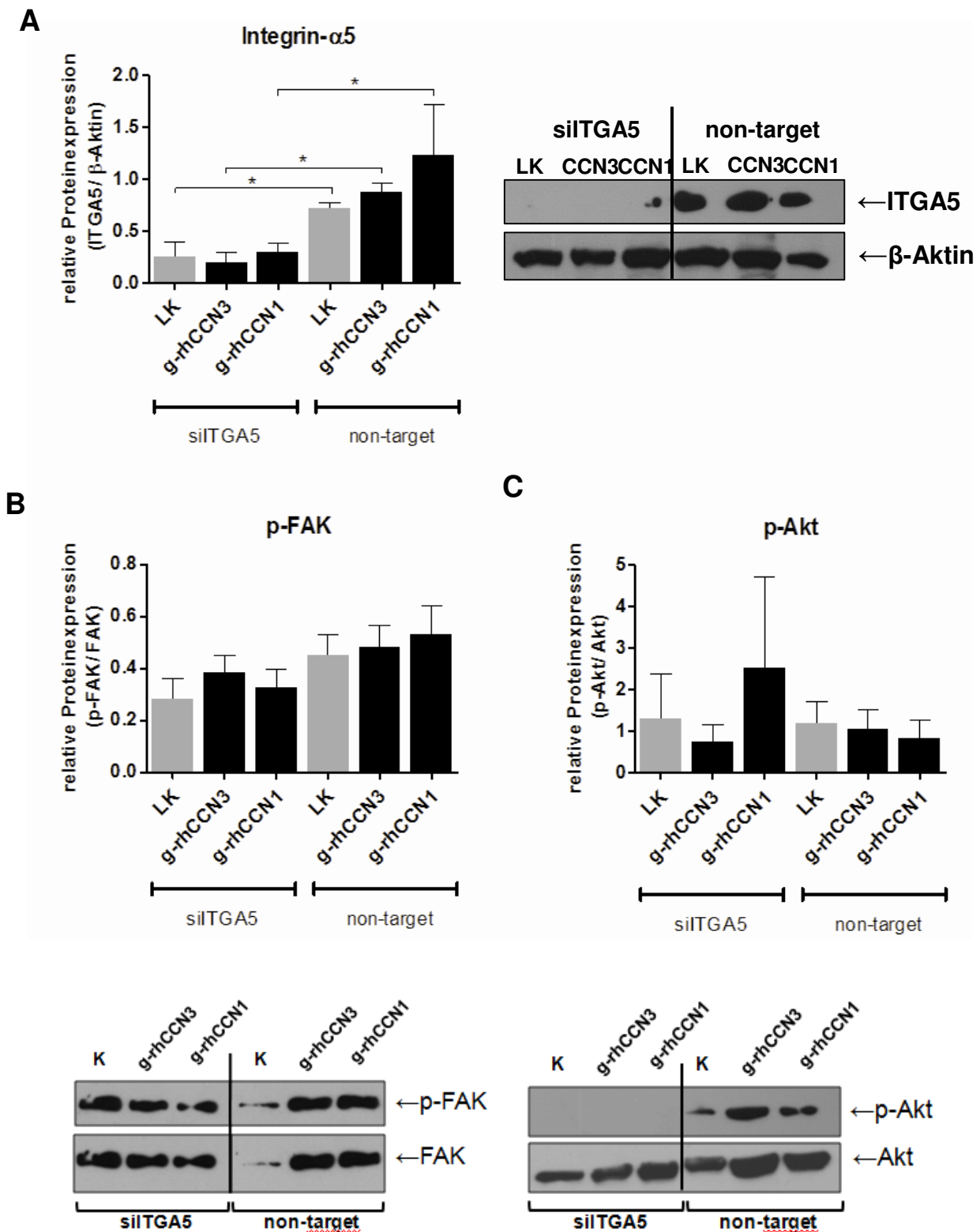


Abb. 31: Auswirkung eines siRNA-Knockdowns von Integrin $\alpha 5$ auf die CCN1 und CCN3 abhängige Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase FAK und der P13k/ Akt Kinase

(A) Relative Proteinexpression des Integrin $\alpha 5$ nach Knockdown mit 150 nM siRNA (siTGA5) für 48 h im Abgleich zu β -Aktin. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA (non-target) Dargestellt sind die densitometrische Auswertung ($n = 3$) und ein exemplarischer Western Blot. (B) Phosphorylierung von FAK nach achtstündiger Behandlung mit glykosyliertem CCN1/3 (g-rhCCN1/3). (C) Phosphorylierung von Akt nach achtstündiger Behandlung mit glykosyliertem CCN1/3 (g-rhCCN1/3). K = unbehandelte Kontrolle; LK = Lösungsmittelkontrolle; $n = 3$.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der beiden CCN-Proteine CCN1 und CCN3 bei der Regulation der Trophoblastproliferation und –invasion mit Hilfe der plazentaren Trophoblastzelllinie SGHPL-5 untersucht. Der Ausstieg der Trophoblastzellen aus dem Zellzyklus und die anschließende Differenzierung in den invasiven Phänotyp sind zentrale Prozesse der Plazentation, die von der exakten Koordination von Proliferations-, Differenzierungs- und Invasionseigenschaften der Trophoblastzellen abhängen. Der Fokus dieser Arbeit liegt hierbei auf den molekularen Regulationsmechanismen und Signalkaskaden, die den Vorgang, der die proliferativen CTBs der Zellsäule in den invasiven Phänotyp, der sich von der Zellsäule ablöst und tief in die Dezidua einwandert, kontrollieren. Frühere Arbeiten zeigten, dass CCN1 und CCN3 in der humanen Plazenta stark in den nicht-proliferierenden interstitiellen Trophoblast-Riesenzellen, den vaskulären Endothelzellen und den mesenchymalen und stromalen Zellen der plazentaren Stammzotten exprimiert werden (Gellhaus et al. 2006), in den Plazenten und Seren von präeklampsischen Schwangeren dagegen aber signifikant verringert waren (Gellhaus et al. 2006; Gellhaus et al. 2007). Weitere Studien anhand der Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 legten nahe, dass CCN3 ein Ungleichgewicht zwischen der Proliferation und Migration der humanen Trophoblastzellen bewirkt und so zu der unzureichenden Trophoblastinvasion in die Dezidua und dem unzureichenden Umbau der Spiralarterien in präeklampsischen Plazenten beitragen könnte (Yang et al. 2011; Wagener et al. 2013). Durch Behandlung mit sowohl der glykosylierten als auch der unglykosylierten Form von rekombinantem humanen CCN1 und CCN3 sollten zellbiologische Prozesse und deren molekulare Regulation, die in direktem Zusammenhang mit dem Proliferations- und Migrationsverhalten stehen, anhand der plazentaren Trophoblastzelllinie SGHPL-5 im Detail untersucht werden.

4.1 Die benigne Trophoblastzelllinie SGHPL-5 als Modellsystem zur Untersuchung der Proliferations- und Migrationsregulation des extravillösen Trophoblasten

Die benigne, durch Transfektion mit dem großen T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) immortalisierte, Trophoblastzelllinie SGHPL-5 stammt aus plazentarem Ersttrimestergewebe (Choy und Manyonda 1998; Cartwright et al. 1999; Choy et al. 2000) und ist mit einer auf 20 bis 25 Passagen limitierten Lebensspanne kultivierbar. SGHPL-5 Zellen zeigen im

Gegensatz zu der Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 keine Transformationen, wie z.B. den Verlust der Kontaktinhibition (Shiverick et al. 2001). Aus Chorionkarzinomen stammende Zelllinien sind einer Krebszelllinie ähnlicher als der ursprünglichen Trophoblastzelllinie. Da die Trophoblastinvasion und die Invasion von Krebszellen durchaus in einigen Aspekten sehr ähnlich sind, aber auf der anderen Seite Trophoblastzellen eben nicht unkontrolliert proliferieren, wie dies bei Krebszellen der Fall ist, sind gerade diese für die Untersuchung der Regulation der Proliferation des Trophoblasten sehr ungeeignet. Primärkulturen und placentare Explants hingegen sind oft aus Gründen der Verfügbarkeit von placentaren Geweben aus der frühen Schwangerschaft und aus ethischen Gründen begrenzt, so dass eine benigne Zelllinie wie SGHPL-5 ein gut verfügbares und dem ursprünglichen Trophoblasten ähnliches Modellsystem darstellt. SGHPL-5 Zellen wurden bereits erfolgreich für Studien zur Regulation der Trophoblastmigration und -differenzierung eingesetzt: Im Zusammenhang mit rekombinantem humanen Endostatin konnte in villösen Explantkulturen als auch in SGHPL-5 Trophoblastzellen eine erhöhte MMP-2 Expression nachgewiesen werden (Pollheimer et al. 2004). Endostatin inhibiert sowohl die unstimulierte als auch die IGF-II-vermittelte Zellmotilität der SGHPL-5 Zellen und unterdrückt die IGF-II-induzierte Phosphorylierung von FAK, Akt, mTOR (mammalian target of rapamycin) und der p70 S6 Kinase (S6K) und in einem geringeren Ausmaß auch ERK1/2 (Pollheimer et al. 2011). Im Kontext der invasiven Trophoblastdifferenzierung wurde in SGHPL-5 Zellen eine Beteiligung des kanonischen Wnt-Signalweges nachgewiesen, dessen Aktivierung die invasive Differenzierung fördert (Pollheimer et al. 2006; Sonderegger et al. 2007). Wingless-type MMTV integration site family, member 3A (Wnt-3A) induziert dabei die Trophoblastmigration und Sezernierung von MMP-2 durch den kanonischen Wnt-Signalweg und Aktivierung von Akt in SGHPL-5 Zellen (Sonderegger et al. 2010). Eine gesteigerte Trophoblastinvasion und -migration in SGHPL-5 Zellen durch Aktivierung des ERK- und Akt-Signalweges sowie deren nachgeschalteter Effektor MMP-2 konnte durch hCG nachgewiesen werden (Prast et al. 2008; Biadasiewicz et al. 2011). Eine Expression der Akt-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 konnte in primären villösen und extravillösen Trophoblasten sowie in den Zelllinien Jeg3, HTR-8/SVneo und SGHPL-5 nachgewiesen werden. Die Akt-Isoformen 1 und 3 scheinen die basale und die EGF-induziert Trophoblastmigration zu fördern (Haslinger et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie SGHPL-5 einen hohen Proteinlevel der intrazellulären Form von CCN1 aufweist, wohingegen CCN3 auf geringem mRNA-Level nachweisbar war. Neben der Behandlung mit rekombinanten CCN1- und CCN3-Proteinen wäre so auch eine Überexpression von CCN3 oder ein Knockdown der CCN1-Expression möglich, um

Auswirkungen der beiden Protein auf die Regulationsmechanismen der Trophoblastproliferation und -invasion zu untersuchen. Um neben der Behandlung mit rekombinantem Protein, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, die Rolle von CCN3 bei zukünftigen Versuchen auch mit endogenem CCN3 bestätigen zu können, wurden bereits SGHPL-5 Zellen mit einem Doxzyklin-induzierbaren Tet-On System, das für das vollständige humane CCN3 Protein kodiert, lentiviral transfiziert.

4.2 Der Einfluss des Glykosylierungsstatus von CCN1 und CCN3 auf das zellphysiologische Verhalten von Trophoblastzellen

CCN-Proteine sind sezernierte Proteine, die mit der extrazellulären Matrix assoziiert sind. Wie bei vielen sezernierten, extrazellulären Proteinen spielt auch hier die Glykosylierung eine Rolle. So weist z.B. CCN3 in seiner Polypeptid-Sequenz zwei N-Glykosylierungsstellen an den Asparaginresten Asn97 und Asn280 auf (Chevalier et al. 1998). Ein Einfluss der N-Glykosylierung auf die Funktion des Proteins liegt nahe, da z.B. in malignen und benignen Tumoren der Nebennierenrinde N-glykosyliertes CCN3 gefunden wurde, während im normalen Gewebe die unglykosylierte Form vorherrschte (Martinerie et al. 2001). In CCN3-überexprimierenden Jeg3 Zellen konnte durch verschiedene Endoglykosidasen nachgewiesen werden, dass es sich um eine intrazellulär auftretende unglykosylierte Form von ca. 48 kDa und eine sezernierte N-glykosylierte Form mit komplexen Kohlenhydratketten von ca. 55 kDa mit unterschiedlichen Funktionen in der Regulation der Migrations- und Proliferationseigenschaften handelt (Yang et al. 2011; Wagener et al. 2013). Auch im Zellüberstand von CCN3-überexprimierenden COS-7 Zellen konnte die sezernierte N-glykosylierte Form mit komplexen Kohlenhydratketten nachgewiesen werden (Bohr et al. 2010). Die spezifischen Glykosylierungsstellen für CCN1 sind bisher nicht bekannt. Das Auftreten einer unglykosylierten intrazellulär auftretenden Form von ca. 43 kDa und einer sezernierten glykosylierten Form von ca. 70 kDa wurde aber bereits beschrieben (Gashaw et al. 2008) und auch hier werden unterschiedliche Funktionen der beiden Formen angenommen (Yang und Lau 1991). Die endogene Menge an CCN3 war in den parentalen SGHPL-5 Zellen sehr gering. CCN3 konnte ausschließlich auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, während im Fall CCN1 die intrazellulär auftretende unglykosylierte Form auch auf Proteinebene im Western Blot nachweisbar war. Um dennoch eventuelle Unterschiede in der Funktion von CCN1 und CCN3 in Abhängigkeit des Glykosylierungsstatus untersuchen zu können, wurden

im Rahmen dieser Arbeit die SGHPL-5 Zellen mit kommerziell erworbenem rekombinanten humanen CCN1 und CCN3 aus verschiedenen Expressionssystemen behandelt. Das unglykosylierte ng-rhCCN1/3 stammt aus dem prokaryotischen Expressionssystem *E. coli* und entspricht der intrazellulär auftretenden Form. Das glykosylierte g-rhCCN1/3 stammt aus murinen Myelomzellen und entspricht damit der sezernierten Form. Die Behandlung der SGHPL-5 Zellen mit der unglykosylierten Form der beiden CCN-Proteine durch Zugabe in das Kulturmedium entspricht dabei auf den ersten Blick nicht der physiologischen Situation, die die unglykosylierte Form nur intrazellulär beschreibt. Jedoch konnte bereits in anderen Studien eine Internalisierung von äußerlich zugegebenem rekombinanten CCN3 nachgewiesen werden (Sin et al. 2009) und auch in Jeg3 Zellen wurde eine migrationsfördernde Wirkung ausschließlich für das von außen zugegebene unglykosylierte rekombinante CCN3 beschrieben (Wagener et al. 2013). Für zukünftige Studien wurde ein Doxzyklin-induzierbares Überexpressionssystem von CCN3 in lentiviral transduzierten SGHPL-5/ tetO-CCN3 etabliert, in dem sich sowohl eine intrazelluläre Form von ca. 42 kDa und eine sezernierte Form von ca. 55 kDa nachweisen lässt. Ein entsprechendes System für CCN1 wäre denkbar und für weitere Untersuchungen anwendbar. Zusätzlich könnten über dieses System auch Varianten von CCN1 und CCN3 eingeführt werden, deren Bindungsstellen für den Notch1-Rezeptor oder das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ mutiert und nicht mehr funktionell sind, um so eine direkte Interaktion genauer zu untersuchen. Im Großen und Ganzen konnten aber in SGHPL-5 Zellen keine Unterschiede zwischen den Auswirkungen von unglykosyliertem und glykosyliertem CCN1/3 festgestellt werden. Zumindest die Tendenz war für beide Formen immer ähnlich. So haben beispielsweise beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 eine proliferationshemmende Wirkung auf die SGHPL-5 Zellen und vermitteln diese über Aktivierung des Notch1-Rezeptors und dessen Zielgen $p21^{Waf1/Cip1}$ mit gleichzeitiger Hochregulierung von Cyclin D1 sowie des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors und Seneszenz-Markers $p16^{INK4A}$. Auch die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität wurde durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 gleichermaßen erhöht. Lediglich die Ausprägung jeweiligen Veränderungen waren etwas unterschiedlich, so war beispielsweise die Proliferationsreduktion gemessen an der Gesamtzellzahl durch die glykosylierte Form von CCN1 und die unglykosylierte Form von CCN3 am ausgeprägtesten, während bei der immunzytochemischen Anfärbung des Proliferationsmarkers KI-67 oder der Analyse der Zellzyklusphasenverteilung keine Unterschiede zwischen glykosylierter und unglykosylierter Form festzustellen waren. Dies könnte auf qualitative Unterschiede bei verschiedenen Chargen der kommerziell erworbenen

CCN-Proteine zurückzuführen sein, da diese nur in kleinen Mengen erhältlich sind, war es nicht möglich, alle Versuche aus der gleichen Charge abzudecken.

4.3 Regulation der Proliferationseigenschaften von SGHPL-5 Trophoblastzellen durch CCN1 und CCN3

4.3.1 CCN1 und CCN3 haben eine proliferationshemmende Wirkung auf SGHPL-5 Trophoblastzellen

Der Ausstieg der Trophoblastzellen aus dem Zellzyklus und die folgende Differenzierung in den invasiven Phänotyp sind zentrale Prozesse der Plazentation, die von der exakten Koordination der Proliferations-, Differenzierungs- und Invasionseigenschaften der Trophoblastzellen abhängen. Ein Teil der CTBs behält während der gesamten Schwangerschaft einen undifferenzierten Phänotyp bei und bildet so ein Reservoir an plazentaren Stammzellen. Aus dem übrigen Teil der CTBs bilden sich im Wesentlichen zwei Subpopulationen an Trophoblastzellen: STBs und invasive CTBs. Bisher ist wenig bekannt über das exakte Zusammenspiel und die Regulation der Zellzyklusregulatoren, die bestimmen, ob die Zytotrophoblastzellen weiter proliferieren oder einem Arrest oder Ausstieg aus dem Zellzyklus unterliegen, um die Differenzierung zu ermöglichen (Genbacev et al. 2000; Korgun et al. 2006). Beide Glykosylierungsformen der CCN1 und CCN3 Proteine (ng-rhCCN1/3 und g-rhCCN1/3) reduzierten die Proliferation von SGHPL-5 Trophoblastzellen, wobei g-rhCCN1 und ng-rhCCN3 im Hinblick auf die Gesamtzellzahl den stärksten Effekt aufwiesen. Dieses Ergebnis korrelierte mit der verminderten Expression des Proliferationsmarkers KI-67 durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3. Eine proliferationshemmende und gleichzeitig migrationsfördernde Wirkung von CCN3 im Trophoblasten konnte bereits anhand der malignen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 gezeigt werden (Yang et al. 2011; Wagener et al. 2013), während für CCN1 bisher nur die migrations- und invasionsfördernde Wirkung bekannt war (Wolf et al. 2010). Eine durch CCN1 und CCN3 induzierte verstärkte Zellablösung oder Apoptose schienen nicht die vorrangigen Gründe für die reduzierte Zellproliferation zu sein. So konnte zwar eine leichte Steigerung der Zellablösung durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 festgestellt werden, aber weder die glykosylierte noch die unglykosylierte Form von CCN3 hatten einen Einfluss auf den Anteil apoptotischer Zellen. Lediglich g-rhCCN1 löste nach 24-stündiger Behandlung einen signifikanten Anstieg des Anteils

apoptotischer Zellen aus. Diese Ausnahme konnte jedoch nicht durch die Proteinexpression von phospho-p53 und Caspase-3 bestätigt werden, diese blieb in allen Fällen unverändert. Erst die Analyse der Zellzyklusphasenverteilung zeigte, dass die proliferationshemmende Wirkung von beiden Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 über einen Arrest der Zellen in der G0/1-Phase des Zellzyklus erfolgt. Der Anteil der in der G2/M-Phase befindlichen Zellen wurde durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 signifikant verringert, während nur unglykosyliertes CCN3 einen signifikant verringerten Anteil der Zellen in der S-Phase bewirkte. Der Arrest oder Ausstieg aus dem Zellzyklus ist die Voraussetzung für eine Zelle in postmitotische Zustände, wie die Quieszenz, die Seneszenz oder die terminale Differenzierung überzugehen. Bisher ist wenig bekannt über das exakte Zusammenspiel und die Regulation der Zellzyklusregulatoren, die bestimmen, ob die Zytotrophoblastzellen weiter proliferieren oder einem Arrest oder Ausstieg aus dem Zellzyklus unterliegen, um die Differenzierung zu ermöglichen (Genbacev et al. 2000; Korgun et al. 2006). Von der terminalen Differenzierung muriner Trophoblast-Riesenzellen weiß man, dass diese durch Endoreduplikation gekennzeichnet ist (MacAuley et al. 1998). CCN1 und CCN3 bewirkten jedoch im untersuchten Zeitraum keine Zunahme an polyploiden Zellen ($n > 4$). Beide Proteine schienen jedoch in SGHPL-5 Trophoblastzellen einen Zustand der Seneszenz zu induzieren.

4.3.2 Die proliferationshemmende Wirkung von CCN1 und CCN3 erfolgt vermutlich über den Notch1 Rezeptor und dessen Zielgen p21^{Waf1/Cip1}

Es ist bekannt, dass der Notch1-Rezeptor in den Zytotrophoblastzellen der humanen Plazenta exprimiert wird (De Falco et al. 2007) und den Cyclin/CDK Inhibitor p21^{Waf1/Cip1} als Zielgen der Notch-1 Aktivierung reguliert (Devgan et al. 2005). In Lungenkrebszellen wurde beschrieben, dass die Aktivierung des Notch1-Rezeptors und seines Zielgens p21^{Waf1/Cip1} einen Zellzyklusarrest auslöst (Sriuranpong et al. 2001). Darüber hinaus spielt der Notch-Signalweg eine wichtige Rolle in der Regulation der Proliferation der Zellsäule, der Trophoblastinvasion und der Differenzierung des extravillösen Trophoblasten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung dieses Signalweges in primären EVT's und der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 die Proliferation der Zellsäule, die Invasion und die Expression von EVT-Markern steigerte (Haider et al. 2012). Für CCN3 wurde bereits gezeigt, dass durch Assoziation mit dem Notch1 Rezeptor im Rahmen der Myoblast-Differenzierung der Notch-Signalweg ausgelöst wird (Sakamoto et al. 2002). Auch für CCN1 ist die Interaktion mit dem Notch-Signalweg über den

Notch1-Rezeptor beschrieben (Katsube et al. 2009; Haque et al. 2012; Leask 2013). Der Notch-Signalweg scheint auch die proliferationshemmende Wirkung von CCN3 in der Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 zu vermitteln (Wagener et al. 2013). In der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 konnte eine signifikant erhöhte proteolytische Abspaltung der intrazellulären Notch1-Domäne durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 und die glykosylierte Form von CCN3 nachgewiesen werden. Die Expression des Notch1 Zielgens $p21^{Waf1/Cip1}$ wurde durch beide Glykosylierungsformen von CCN1 signifikant hochreguliert. Eine Tendenz zur verstärkten $p21^{Waf1/Cip1}$ Expression war ebenfalls durch beide Glykosylierungsformen von CCN3 erkennbar. Um einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Notch1-Rezeptors und der Hochregulierung von $p21^{Waf1/Cip1}$ durch CCN1 und CCN3 zu bestätigen, wurden die Auswirkungen der Behandlung mit glykosyliertem CCN1 und CCN3 auch bei gleichzeitiger Gabe des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT untersucht. Im Einzelfall konnte eine verminderte Hochregulierung von $p21^{Waf1/Cip1}$ bei gleichzeitiger Inhibierung der Aktivierung des Notch1-Rezeptors nachgewiesen werden, jedoch funktioniert die Inhibierung der proteolytischen Spaltung des Notch1 Rezeptors durch DAPT in den SGHPL-5 Zellen nicht zuverlässig, d.h. teilweise fand bei Wiederholung der Versuche keine oder keine vollständige Inhibierung statt, so dass keine statistische Auswertung möglich war. Es ist auch denkbar, dass die proliferationshemmende Wirkung von CCN1 und CCN3 auf die SGHPL-5 Trophoblastzellen nicht ausschließlich über den Notch1-Rezeptor vermittelt wird, sondern dass auch noch andere Rezeptoren beteiligt sind. Um den direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Notch1-Rezeptors und der Hochregulierung seines Zielgens $p21^{Waf1/Cip1}$ zu untersuchen, könnten für zukünftige Versuche weitere γ -Sekretase-Inhibitoren auf bessere Wirksamkeit in der Zelllinie SGHPL-5 getestet werden. Als naheliegendes Beispiel ist der γ -Sekretase-Inhibitor L-685,458 zu nennen, der bereits in SGHPL-5 Zellen angewendet wurde (Haider et al. 2012). Da die Expression des Notch1-Rezeptors in den parentalen SGHPL-5 Zellen eher gering ist, wäre es auch möglich, durch z.B. lentivirale Gentransduktion Klone der Zelllinie zu generieren, die Notch1 überexprimieren. In diesem Zusammenhang kann ein Vergleich des Wildtyp-Notch1 mit einer Funktionsverlust-Mutante für die CCN-Bindungsstelle des Notch1-Rezeptors durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob sich bei Behandlung mit CCN1 und CCN3 Unterschiede in der Hochregulierung des Notch1-Zielgens $p21^{Waf1/Cip1}$ ergeben.

4.3.3 CCN1 und CCN3 induzieren neben der gleichzeitigen Akkumulierung von p21^{Waf1/Cip1} und D1 auch den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor und Seneszenz-Marker p16^{INK4A} sowie eine verstärkte Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität

Beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 verursachen einen G0/G1-Zellzyklusarrest, der wahrscheinlich durch die Aktivierung des Notch1-Rezeptors und seines Zielgens p21^{Waf1/Cip1} vermittelt wird. Daneben treten eine signifikant erhöhte Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase durch Behandlung der SGHPL-5 Zellen mit beiden Glykosylierungsformen von CCN3 und der glykosylierten Form von CCN1 sowie ein tendenzieller Anstieg durch die unglykosylierte Form von CCN1 auf. Auch die Protein-Expression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors und Seneszenzmarkers p16^{INK4A} ist nach Behandlung mit CCN1 und CCN3 signifikant erhöht, lediglich unglykosliertes CCN3 zeigt nur eine Tendenz. Zudem löst die Behandlung mit CCN1 und CCN3 in SGHPL-5 Zellen eine gleichzeitige Akkumulierung von p21^{Waf1/Cip1} und Cyclin D1 aus, die bereits in der zellulären Seneszenz anderer Zelltypen beschrieben wurde (Alt et al. 2002; Coleman et al. 2003). Cyclin D1 sorgt normalerweise durch ansteigende Konzentrationen während der G1-Phase des Zellzyklus als positiver Zellzyklusregulator für den Übergang einer Zelle von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus (Pines 1999). Eine verminderte Proliferationsrate ist jedoch nicht notwendigerweise mit einem Abfall des Cyclin D1 Expressionslevels verbunden (Ullmannova et al. 2003). Die gleichzeitige Akkumulierung von p21^{Waf1/Cip1} und Cyclin D1 kann in seneszenten Zellen auftreten (Alt et al. 2002; Coleman et al. 2003). Dies scheint auch bei der CCN1/3-induzierten Seneszenz in SGHPL-5 Zellen der Fall zu sein. Um die Regulation dieses Vorganges genauer zu beleuchten, wurde die Expression weiterer Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitoren bei Behandlung mit CCN1 und CCN3 untersucht. Auf mRNA-Ebene konnte keine statistisch signifikante Auswirkung auf das Expressionslevel von p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} festgestellt werden. CCN1 bewirkt aber eine tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung des mRNA Expressionslevels von p16^{INK4A} nach 4 h, während CCN3 eine tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung von p15^{INK4B} nach 2 h bewirkt. Auf Proteinebene bewirkte nur die glykosylierte Form von CCN1 eine signifikante Verminderung des Expressionslevels von p27^{Kip1}, während im Fall von p57^{Kip2} auch auf Proteinebene keine Veränderungen im Expressionslevel durch Behandlung mit CCN1 oder CCN3 zu verzeichnen waren. Das Proteinexpressionlevel des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors und Seneszenz-Markers p16^{INK4A} war signifikant erhöht. Jeder dieser untersuchten Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren kann eine Rolle in der Vermittlung von G0/G1-Zellzyklus-Arresten spielen. So werden p16^{INK4A}, p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} Schlüsselrollen in der zellulären Seneszenz

zugesprochen (Bringold und Serrano 2000), während p57^{Kip2} mit terminal differenzierten Zellen (Yan et al. 1997), sowie der Endoreduplikation und Polyploidie in Verbindung gebracht (Hattori et al. 2000) wird. In mit CCN1 oder CCN3 behandelten SGHPL-5 Zellen konnte im untersuchten Zeitraum weder eine erhöhte Expression von p57^{Kip2} noch ein vermehrtes Auftreten von polyploiden Zellen nachgewiesen werden, so dass eine Rolle von CCN1 und CCN3 bei der Induzierung der Endoreduplikation und Polyploidie in Trophoblastzellen unwahrscheinlich ist. Die erhöhte Expression von p16^{INK4A} und p21^{Waf1/Cip1} in Kombination mit der erhöhten β -Galaktosidase-Aktivität legen nahe, dass ein Zustand der zellulären Seneszenz eintritt. Eine Induktion der zellulären Seneszenz durch CCN1 wurde bereits in verschiedenen Zelltypen, wie Fibroblasten (Jun und Lau 2010), hepatischen Myofibroblasten (Kim et al. 2013) oder auch Zelllinien des okkulten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (*engl.: non-small-cell lung carcinoma*; NSCLC) (Leu et al. 2013) beschrieben. Sowohl p16^{INK4A} als auch p21^{Waf1/Cip1} sind Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren, die die Phosphorylierung von RB durch den Cyclin D1-CDK4/6 Komplex verhindern und es dadurch in der aktiven, hypophosphorylierten Form halten, sodass E2F nicht freigesetzt werden und die Transkription der für die Proliferation benötigten Gene nicht initiieren kann (Sherr und McCormick 2002). Eine signifikante Änderung des Phosphorylierungsstatus von Rb konnte jedoch durch Behandlung der SGHPL-5 Zellen mit CCN1 und CCN3 im untersuchten Zeitraum nicht beobachtet werden. Nur durch 48 stündige Behandlung mit glykosyliertem CCN1 zeigte sich ein tendenziell geringeres Level an phosphoryliertem Rb. Ein Grund hierfür könnte sein, dass durch den vorhergehenden Serumentzug zur Synchronisierung des Zellzyklus, das Level an hypophosphoryliertem Rb bereits so gering war, dass eine weitere Reduzierung nicht mehr messbar war. In zukünftigen Versuchen sollte hier getestet werden, ob die Versuche auch ohne vorhergehenden Serumentzug durchgeführt werden können. Eine gleichzeitige Akkumulierung von Cyclin D1 und p21^{Waf1/Cip1} wurde bereits in einigen seneszenten Zellen beschrieben (Alt et al. 2002; Burton et al. 2007; Burton 2009). Wenn nahezu alle Cyclin D1-CDK Komplexe mit p21^{Waf1/Cip1} assoziiert sind, kann keine Phosphorylierung von Rb mehr stattfinden (Dulic et al. 1993; Atadja et al. 1995). Nur auf einem niedrigen Expressionslevel scheint Cyclin D1 also das Durchlaufen des Zellzyklus durch Phosphorylierung und damit einhergehende Neutralisierung der inhibitorischen Aktivität von Rb zu fördern. Erhöhte Cyclin D1 Expressionslevel wirken sich jedoch durch die Stabilisierung von p21^{Waf1/Cip1} und die daraus folgende Inhibierung der Phosphorylierung von Rb durch den Cyclin D1-CDK Komplexes negativ auf den Zellzyklus aus, es resultiert ein Zellzyklusarrest (Burton et al. 2007; Burton 2009). Die Akkumulierung von Cyclin D1 in seneszenten Zellen könnte auf das erhöhte p21^{Waf1/Cip1} zurückzuführen sein

(Alt et al. 2002). Der Anstieg von Cyclin D1 inhibiert die Proteasom-vermittelte Degradierung von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ (Coleman et al. 2003). Zu Beginn der Seneszenz ist $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ erhöht und fördert die nukleäre Akkumulation von Cyclin D1, wodurch wiederum $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ stabilisiert und dessen weitere Akkumulation gefördert wird (Burton et al. 2007; Burton 2009). Die vorliegenden Ergebnisse anhand der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 verdeutlichen, dass CCN1 und CCN3 ihre proliferationshemmende Wirkung auf Trophoblastzellen durch Aktivierung des Notch1-Rezeptors und die Hochregulierung seines Zielgens $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ bewirken. Eine gleichzeitige Akkumulation von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ und Cyclin D1 und die Beteiligung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors und Seneszenzmarkers $p16^{\text{INK4A}}$ führen hierbei wahrscheinlich zu einer Induktion der zellulären Seneszenz. Zum Beweis sollten aber hier noch Versuche zur Reversibilität des Zellzyklusarrests durchgeführt werden.

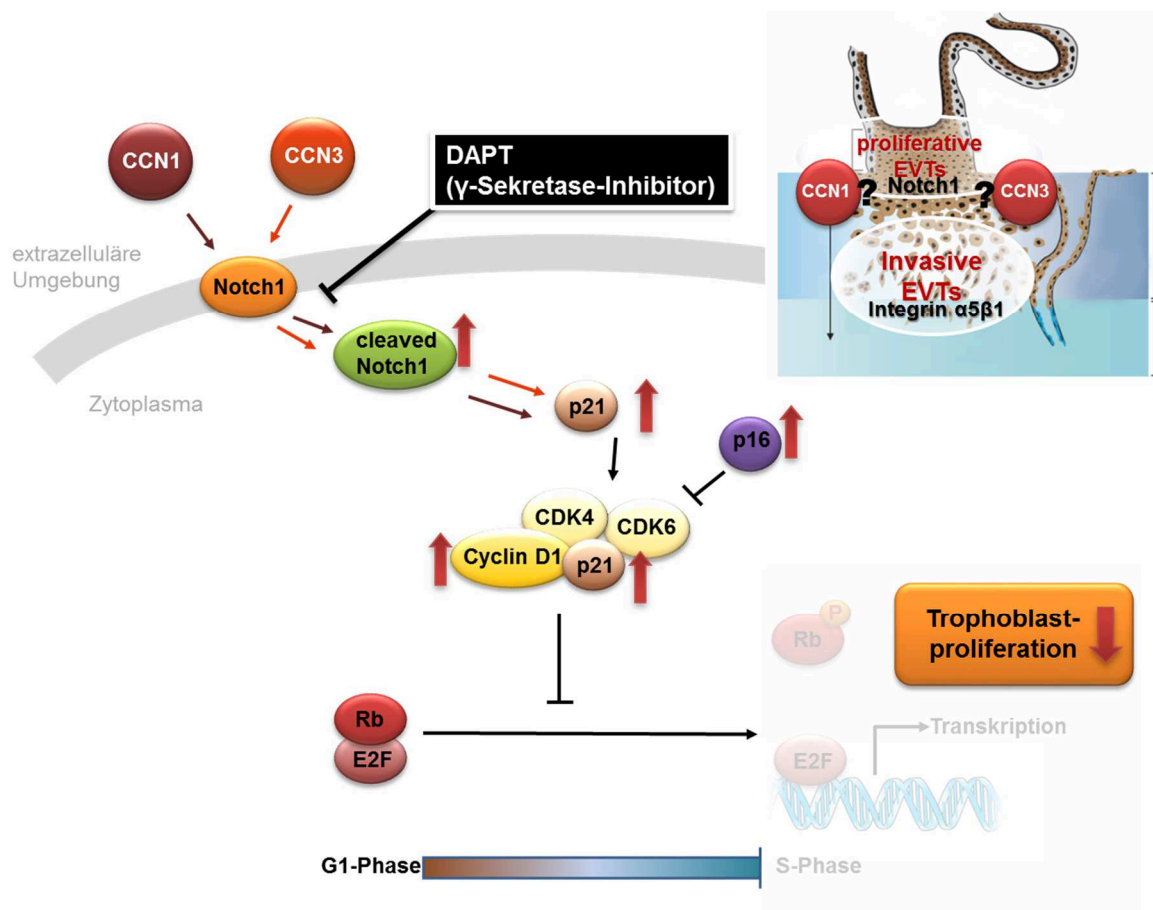


Abb. 32: Regulation der Trophoblastproliferation durch CCN1 und CCN3.

Die proliferationshemmende Wirkung von CCN1 und CCN3 wird über die Aktivierung des Notch1-Rezeptors und die Hochregulierung seines Zielgens $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ vermittelt. In seneszenten Zellen bewirken erhöhte Cyclin D1 Expressionslevel durch Stabilisierung von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ und die daraus folgende Inhibition der Phosphorylierung von Rb durch den Cyclin D1-CDK Komplex einen Zellzyklus-Arrest. Zusätzlich ist der Seneszenzmarker $p16^{\text{INK4A}}$ erhöht (Teile der Abbildung verändert nach: Kondo et al. 2006; Knöfler 2010).

4.4 Migration

4.4.1 CCN1 und CCN3 verstärken das Migrationsverhalten von SGHPL-5 Zellen vermutlich durch Signalübermittlung über den Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Rezeptor

Neben einer proliferationshemmenden Wirkung von CCN1 und CCN3 konnte eine gleichzeitige Steigerung der Migrationskapazität insbesondere durch die glykosylierten Formen von CCN1 und CCN3 beobachtet werden. Ein wichtiger Aspekt der Zellmigration/ -invasion ist die FAK/ Akt-vermittelte Erhöhung der Expression und Aktivität der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 (Chung et al. 2004; Cheng et al. 2006; Park et al. 2006; Chen et al. 2010). Die mit glykosyliertem CCN1 und CCN3 behandelten SGHPL-5 Zellen wiesen auch eine signifikant verstärkte Expression der Matrixmetalloproteinase MMP-9 auf, eine Beteiligung von CCN1 und CCN3 an der Invasion liegt daher nahe. Die Signalübermittlung der CCN Proteine zur Regulation der Zellmigration und -invasion wird bekanntermaßen über Rezeptoren wie Integrine vermittelt (Chen und Lau 2009). Für CCN1 sind die Integrine $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha M \beta 2$ und $\alpha I I b \beta 3$ (Desnoyers 2004), für CCN3 die Integrine $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 6 \beta 1$ (Chen und Lau 2009) als Interaktionspartner in der Literatur beschrieben worden. In der Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 konnte gezeigt werden, dass das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ für die Signalübermittlung und Regulation der Migrationskapazität von CCN3 verantwortlich ist (Wagener et al. 2013). Eine migrationsfördernde Wirkung wurde in den Jeg3 Zellen ausschließlich für unglykosyliertes rekombinantes CCN3 beschrieben (Wagener et al. 2013). In den SGHPL-5 Zellen konnte die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$ nachgewiesen werden. Für die Untereinheit Integrin $\beta 1$ waren keine Änderungen im Expressionslevel auf mRNA-Ebene zu beobachten, während im Falle von Integrin $\alpha 5$ die mRNA Expression durch Behandlung mit beiden Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 leicht erhöht war. Zudem wirkten sich beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 migrationsfördernd aus, die Wirkung war bei den beiden glykosylierten Formen sogar noch ausgeprägter. Daher wurden nur die glykosylierten Formen von CCN1 und CCN3 mittels eines siRNA-Knockdown der Integrin $\alpha 5$ -Untereinheit auf die Beteiligung des Integrins $\alpha 5 \beta 1$ an der Vermittlung der migrationsfördernden Wirkung von CCN1 und CCN3 untersucht. Ein Knockdown der $\alpha 5$ -Untereinheit ist in diesem Fall ausreichend, da diese nur in Verbindung mit der $\beta 1$ -Untereinheit, aber nicht in Verbindung mit anderen β -Untereinheiten auftritt (Buck und Horwitz 1987). Auch wenn im Gesamteindruck das Migrationsverhalten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch die Behandlung der SGHPL-5 Zellen mit Transfektionsreagenz etwas vermindert wurde, konnte durch den siRNA-Knockdown der

Integrin-Untereinheit $\alpha 5$ tatsächlich gezeigt werden, dass im Vergleich zu den mit unspezifischer Kontroll-siRNA behandelten SGHPL-5 Zellen die migrationsfördernde Wirkung von CCN1 und CCN3 aufgehoben war, d.h. die Steigerung der Migrationskapazität der SGHPL-5 Zellen durch Behandlung mit CCN1 und CCN3 ist von dem Integrin $\alpha 5\beta 1$ abhängig.

4.4.2 Die Signalübermittlung von CCN1 und CCN3 über den Integrin $\alpha 5\beta 1$ Rezeptor erfolgt über die Aktivierung von FAK und Akt

Die Fokale Adhäsionskinase (FAK) ist an Integrin-vermittelten Signaltransduktionswegen der extrazellulären Matrix beteiligt und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferation, Migration und Invasion (Schaller 2010). Auch die nachfolgende Aktivierung von Akt und ERK 1/2 wurde bereits im Zusammenhang mit der Regulation der Zellmigration und der FAK-Aktivierung beschrieben (King et al. 1997; Sachdev et al. 2002; Ren et al. 2008; Tureckova et al. 2009). In der Zelllinie SGHPL-5 erfolgte die Phosphorylierung und damit Aktivierung von FAK nur durch die glykosylierte Form von CCN3. Der Phosphorylierungsstatus von FAK wurde aber weder durch glykosyliertes noch unglykosyliertes CCN1 verändert. Die anschließende Phosphorylierung und Aktivierung von Akt konnte entsprechend bei Behandlung mit glykosyliertem CCN3, aber auch bei Behandlung mit beiden Glykosylierungsformen von CCN1 beobachtet werden. Die Phosphorylierung von ERK 1/2 scheint in der CCN1/3-vermittelten Regulation der Migrationskapazität von SGHPL-5 Trophoblastzellen keine Rolle zu spielen, da der Phosphorylierungsstatus von ERK 1/2 weder durch Behandlung mit CCN1 noch durch Behandlung mit CCN3 verändert wurde. Sowohl die Hochregulierung der Integrin $\alpha 5$ mRNA, als auch die Phosphorylierung von FAK und Akt sowie die Hochregulierung der MMP-9 mRNA konnten nur transient festgestellt werden. Die Zeitpunkte der Hochregulierung der mRNA von Integrin $\alpha 5$ und MMP-9 sowie der Phosphorylierung von FAK und Akt stimmen dabei nicht exakt überein, sondern sind z.T. 2 - 4 h verschoben. Diese Schwankungen können sich durch qualitative Unterschiede der bei den einzelnen Versuchen verwendeten Zellchargen oder der verschiedenen Chargen der kommerziell erworbenen CCN-Proteine zurückzuführen sein, da diese nur in kleinen Mengen erhältlich sind, war es nicht möglich, alle Versuche aus der gleichen Charge abzudecken. Möglich ist aber auch, dass diese einzelnen Signaltransduktionsereignisse nicht direkt zusammenhängen, ein direkter Zusammenhang sollte daher durch Verwendung geeigneter

Inhibitoren der einzelnen Schritte, wie die Aktivierung des Integrins $\alpha 5 \beta 1$, die Phosphorylierung von FAK und die Phosphorylierung von Akt sowie deren Auswirkungen auf das Migrationsverhalten, bestätigt werden. Eine Beteiligung des Integrins $\alpha 5 \beta 1$ an der Signalübermittlung von CCN1 und CCN3 zur Regulation der Migrationskapazität in SGHPL-5 Trophoblastzellen auf der Ebene der Aktivierung von FAK und Akt sollte durch einen siRNA-Knockdown der Integrin $\alpha 5$ - Untereinheit bestätigt werden. Die densitometrische Auswertung der Western Blots von phosphoryliertem FAK und phosphoryliertem Akt zeigt keine Veränderung im Phosphorylierungsstatus von FAK durch Behandlung mit CCN1 und CCN3 unter Integrin $\alpha 5$ Knockdown-Bedingungen. Allerdings sind entgegen den Erwartungen auch keine Aktivierung der Fokalen Adhäsionskinase durch Phosphorylierung mehr in den Kontrollen mit unspezifischer siRNA zu erkennen, da wie im exemplarischen Einzelblot in zu erkennen ist, auch die Menge der unphosphoryliertem FAK reguliert ist, so dass sich durch den Abgleich der Effekt in der statistischen Auswertung wieder ausgleicht. Bei der Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung zeigt sich ein ähnliches Bild. Dieser Effekt ist möglicherweise auf die siRNA-Transfektionsmethode zurückzuführen. Es stellte sich bereits bei den Vorversuchen als sehr schwierig heraus, ein geeignetes Transfektionsreagenz zu finden, dass nicht toxisch auf die SGHPL-5 Zellen wirkte, aber dennoch eine ausreichende stabile Wirksamkeit hinsichtlich der Transfektion der siRNA zeigte (Daten nicht gezeigt). Das letztlich in den Versuchen angewendete Transfektionsreagenz FuGENE HD der Firma Promega erfüllte diese Kriterien zwar, scheint aber trotzdem zu stark in das empfindliche Gleichgewicht der Signaltransduktionskaskaden einzugreifen. Es zeigte sich zwar in den Versuchen zum Migrationsverhalten unter Integrin $\alpha 5$ Knockdown-Bedingungen eine deutlich verminderte Migrationskapazität im Vergleich zu den mit unspezifischer siRNA behandelten Kontrollen, aber auch insgesamt ist das Migrationsverhalten im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen, die nicht mit Transfektionsreagenz behandelt wurden, sichtbar vermindert. Das gleiche Problem ergab sich bei verschiedenen Inhibitoren zur spezifischen Inhibierung der FAK- und Akt-Phosphorylierung. Diese wirkten in höheren Konzentrationen entweder toxisch auf die SGHPL-5 Zellen oder zeigten bei geringeren Konzentrationen keine Wirkung. Für zukünftige Experimente könnte hier zum Beispiel ein stabiler Knockdown mittels retroviraler Transduktion mit shRNA/miRNA angewandt werden. In kürzlich veröffentlichten Publikationen wurde dies beispielsweise für den stabilen Knockdown der drei Isoformen Akt1, 2 und 3 in SGHPL-5 Zellen erfolgreich angewandt (Pollheimer et al. 2011; Haslinger et al. 2013). Dass eine virale Transduktion sich in SGHPL-5 Zellen im Gegensatz zur Verwendung

von Transfektionsreagenzien problemlos durchführen lässt, konnte in dieser Arbeit bei der Etablierung des Doxyzyklin-induzierbaren SGHPL-5/tetO-CCN3 - Systems gezeigt werden.

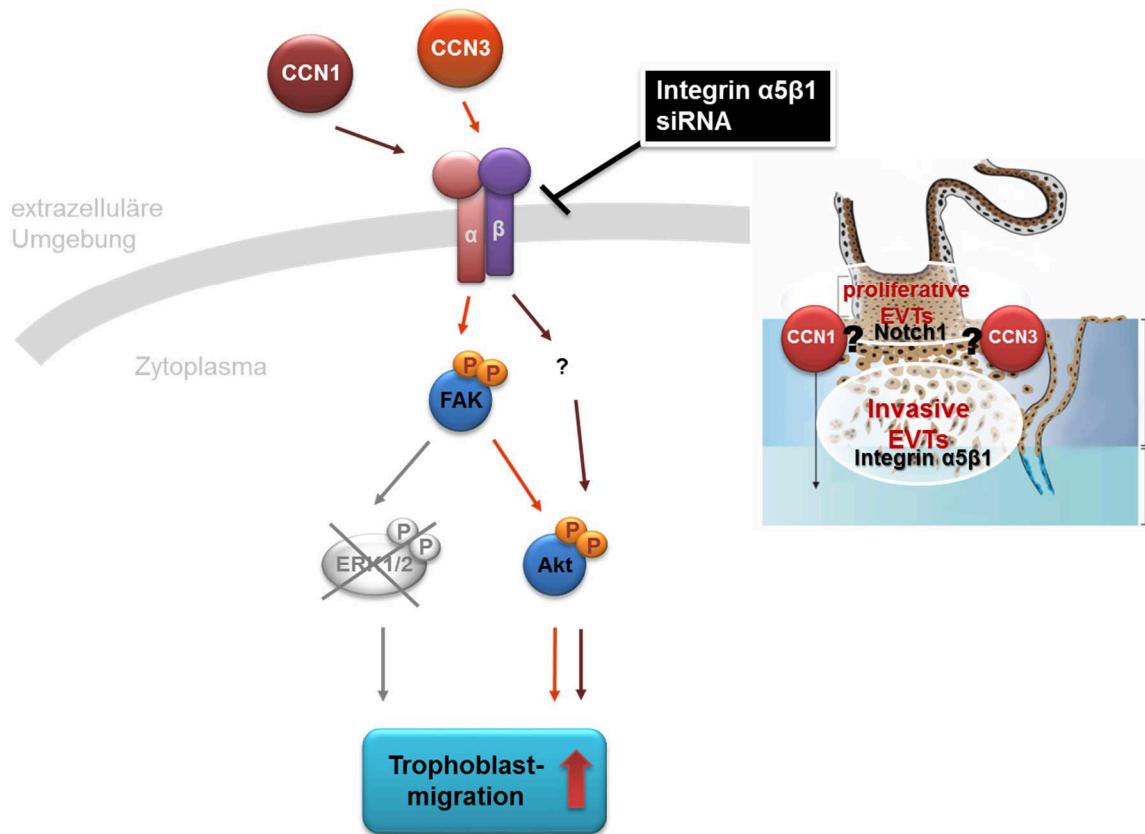


Abb. 33: Regulation der Trophoblastmigration durch CCN1 und CCN3.

Die migrationsfördernde Wirkung in SGHPL-5 Zellen durch CCN3 wird über das Integrin α5β1 vermittelt und erfolgt über Aktivierung von FAK und Akt, während CCN1 nur die Phosphorylierung von Akt auslöst. ERK 1/2 ist nicht an der migrationsfördernden Wirkung beteiligt (Teile der Abbildung modifiziert nach: Knöfler 2010).

4.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand der Zelllinie SGHPL-5 gezeigt werden, dass CCN1 und CCN3 an der Regulation der Differenzierung von proliferierenden Trophoblastzellen der plazentaren Zellsäule in den migrierenden/ invasiven Phänotyp beteiligt sind. Auf der einen Seite lösen CCN1 und CCN3 durch Aktivierung des Notch1-Rezeptors und Hochregulierung seines Zielgens $p21^{Waf1/Cip1}$ einen Zellzyklus-Arrest in der G0/G1-Phase aus. Die gleichzeitige Akkumulation von $p21^{Waf1/Cip1}$ und Cyclin D1, sowie eine erhöhte Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase-Aktivität und erhöhte Expression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors und

Seneszenz-Markern p16^{INK4A} bestätigen, dass die proliferationshemmende Wirkung durch eine Seneszenz vermittelt wird. Auf der anderen Seite wirken CCN1 und CCN3 durch Aktivierung von FAK (nur im Fall von CCN1) und Akt migrationsfördernd. Die Aktivierung von FAK und Akt wird über das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ vermittelt. Um die einzelnen Zusammenhänge dieser beiden Signalkaskaden zu bestätigen und eventuelle Kreuzreaktionen zwischen beiden zu untersuchen, sollten in zukünftigen Experimenten die einzelnen Zwischenschritte durch spezifische Inhibitoren blockiert werden. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, da die getesteten Inhibitoren entweder toxisch wirkten oder keine ausreichende Inhibierungswirkung aufwiesen. Für zukünftige Experimente könnte hier zum Beispiel ein stabiler Knockdown mittels retroviraler mit shRNA/miRNA angewandt werden, wie es beispielsweise kürzlich für einen stabilen Knockdown der drei Isoformen Akt1, 2 und 3 in SGHPL-5 Zellen beschrieben wurde (Pollheimer et al. 2011; Haslinger et al. 2013). Weiterhin könnte durch Bindungsstudien die spezifische Bindung von CCN1 und CCN3 an den Notch1-Rezeptor und das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ bestätigt werden. Da das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ auch eine Rolle in der Proliferationsregulation spielen kann (Enomoto-Iwamoto et al. 1997; Kuwada und Li 2000), sollte auch eine Beteiligung des Integrins $\alpha 5 \beta 1$ an der Regulation der Proliferation in Trophoblastzellen untersucht werden. An dieser Stelle sollten auch noch andere für CCN1 und CCN3 in Frage kommende Rezeptoren untersucht werden, beispielsweise die Integrine $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha \nu \beta 5$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha M \beta 2$ und $\alpha I I \beta 3$ für CCN1 (Desnoyers 2004) und die Integrine $\alpha \nu \beta 5$, $\alpha \nu \beta 3$ und $\alpha 6 \beta 1$ für CCN3 (Chen und Lau 2009). Neben dem Notch1-Rezeptor werden auch Notch2, Notch3 und Notch4 in allen Stadien der humanen Plazenta exprimiert und deren Expressionsmuster legt eine Beteiligung an der Trophoblastregulation nahe (Herr et al. 2011), auch hier könnte eine potentielle Interaktion mit CCN1 und CCN3 untersucht werden. Im Zusammenhang mit der Regulation der Trophoblastmigration und der invasiven Differenzierung unter Beteiligung von Akt wurde in SGHPL-5 Zellen auch der Wnt-Signalweg beschrieben (Pollheimer et al. 2006; Sonderegger et al. 2007; Sonderegger et al. 2010). Möglicherweise ist dieser auch an der Signalübermittlung von CCN1 und CCN3 beteiligt. Ebenfalls würde eine Behandlung mit rekombinantem CCN1/ CCN3 oder die endogene Überexpression von CCN1/CCN3, dessen Bindungsdomäne für den Notch1-Rezeptor bzw. das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ mutiert ist, die Rolle der Interaktion von CCN1 und CCN3 mit den spezifischen Rezeptoren für die Veränderung des zellphysiologischen Verhaltens der Trophoblastzellen beweisen können. Für Akt wurde auch eine Beteiligung der Isoformen 1 und 3 an der Regulation der basalen und Wachstumsfaktor-stimulierten Trophoblastzellmigration in SGHPL-5 beschrieben (Haslinger et al. 2013), auch hier wäre interessant, wie diese in

Zusammenhang mit CCN1 und CCN3 stehen. Da die Genexpressionsprofile von SGHPL-5 Zellen zwar anderen aus EVT's stammenden Trophoblastzelllinien, wie z.B. HTR8/SVneo, sehr ähnlich sind, sich aber von primären CTBs oder EVT's doch unterscheiden (Bilban et al. 2010) und auch die ermittelten Regulationsmechanismen in der benignen plazentaren Trophoblastzelllinie und der malignen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 (Yang et al. 2011; Wagener et al. 2013) ähneln, aber im Detail durchaus Unterschiede aufweisen, wäre es sinnvoll diese anhand von primären Trophoblastzellen aus Plazenten des ersten und zweiten Schwangerschaftstrimesters zu bestätigen. Um eine naheliegende Dysregulation der in dieser Arbeit in SGHPL-5 Trophoblastzellen ermittelten Regulationsmechanismen in präeklampsischen Schwangerschaften zu bestätigen, sollten auch primäre Trophoblastzellen aus präeklampsischen Plazenten untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Die Migration und Invasion des extravillösen Trophoblasten in die maternale Dezidua sind zentrale Prozesse der normalen Entwicklung der humanen Plazenta. Extravillöse Trophoblastzellen (EVTs) ersetzen dabei die Endothelzellen, die die maternalen Spiralarterien auskleiden und wandeln sie in uteroplazentare Gefäße mit stark vergrößertem Gefäßdurchmesser und geringem Widerstand um. Dieser Prozess wird als „spiral arterial remodelling“ bezeichnet und ermöglicht eine adäquate Durchblutung des intervillösen Raumes zur optimalen Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff. Hierfür stellen die stark proliferierenden Trophoblastzellen der plazentaren Zellsäule einen ständigen Nachschub für die nicht mehr proliferierenden Trophoblastzellen dar, die in die maternale Dezidua invadieren. Gleichzeitig muss aber die Proliferation der invadierenden Trophoblastzellen unterdrückt werden, damit es nicht zu einer unkontrollierten krebsartigen Vermehrung kommt, wie z.B. beim Chorionkarzinom. In normalen Schwangerschaften ist die Trophoblastinvasion strikt reguliert. Schwangerschaftserkrankungen wie die Präeklampsie, die mit einer unzureichenden Invasion des Trophoblasten in die Dezidua einhergehen und durch einen mangelnden vaskulären Umbau gekennzeichnet sind, unterstreichen die Bedeutung dieser strikten Regulation. In der humanen Plazenta werden CCN1 und CCN3 insbesondere in den Endothelzellen der Gefäße, den stromalen Zellen und den interstiellen EVT-Riesenzellen exprimiert und weisen ansteigende Expressionslevel im Verlauf der Schwangerschaft auf. Im Vergleich dazu sind die Expressionslevel beider Proteine in präeklampsischen plazentaren Geweben vermindert, was wiederum die Relevanz von CCN1 und CCN3 in diesem Zusammenhang verdeutlicht. In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung der Rolle der beiden matrizellulären Proteine CCN1 (CYR61) und CCN3 (NOV) in der Regulation der Migration und Proliferation der Trophoblastzellen an der feto-maternalen Schnittfläche. CCN1 und CCN3 treten in einer sezernierten glykosylierten und einer unglykosylierten intrazellulären Form auf, die unterschiedliche Funktionen für die Trophoblastproliferation und -migration zu haben scheinen. In dieser Arbeit wurden die Regulationsmechanismen anhand der benignen plazentaren Trophoblastzelllinie SGHPL-5 untersucht, die einen hohen Proteinlevel der unglykosylierten intrazellulären Form von CCN1 aufweist. CCN3 ist auf einem geringen mRNA-Level nachweisbar. Beide Glykosylierungsformen von CCN1 und CCN3 induzierten eine Aktivierung des Notch1-Rezeptors und seines Zielgens p21^{Waf1/Cip1} in SGHPL-5 Trophoblastzellen, was auf einen direkten Einfluss der beiden Proteine auf die Zellzyklusregulation hindeutete. Weiterhin verursachten auch beide Glykosylierungsformen

von CCN1 und CCN3 einen G0/G1-Zellzyklusarrest, der von einer gleichzeitigen Akkumulierung von p21^{Waf1/Cip1} und Cyclin D1, einer verstärkten Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität und einer gesteigerten Expression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors und Seneszenzmarkers p16^{INK4A} begleitet wurde. Diese Befunde sind charakteristische Marker für die zelluläre Seneszenz. CCN1 und CCN3 reduzieren die Proliferationskapazität, indem sie die Trophoblastzellen in einen seneszenten Zustand überführen. SGHPL-5 Zellen zeigten bei Behandlung mit insbesondere den glykosylierten Formen von CCN1 und CCN3 eine gesteigerte Migrationskapazität, während die glykosylierte Form von CCN1 und die unglykosylierte Form von CCN3 den stärksten proliferationshemmenden Effekt auf die SGHPL-5 Zellen aufwiesen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die migrationsfördernde Wirkung der glykosylierten Formen von CCN1 und CCN3 über das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ reguliert und durch Aktivierung von FAK und Akt gesteigert wird. CCN1 und CCN3 wirken also proliferationshemmend und gleichzeitig migrationsfördernd. Je nach Rezeptor könnten sie daher wichtige Regulatoren für den Prozess der Differenzierung der proliferierenden Trophoblastzellen der Zellsäule in den nicht mehr proliferierenden Phänotyp, der in die Dezidua und die Spiralarterien invadiert, darstellen, indem sie den Ausstieg aus dem Zellzyklus und die Migrationseigenschaften fördern. Dies lässt sich auch auf die Plazenta *in vivo* übertragen, da der Rezeptor Notch1 proximal in der Zellsäule und der Rezeptor Integrin $\alpha 5 \beta 1$ distal in den invadierenden EVT's exprimiert werden und somit über die spezifischen Rezeptoren ein räumlich angeordnetes Wirkspektrum erzielt.

6. Literaturverzeichnis

- al-Lamki, R. S., Skepper, J. N. und Burton, G. J. (1999). "Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study." Human reproduction **14**(2): 496-504.
- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D. und Barrett, J. C. (1996). "Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(24): 13742-13747.
- Aliouat-Denis, C. M., Dendouga, N., Van den Wyngaert, I., Goehlmann, H., Steller, U., van de Weyer, I., Van Slycken, N., Andries, L., Kass, S., Luyten, W., Janicot, M. und Vialard, J. E. (2005). "p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2." Molecular cancer research : MCR **3**(11): 627-634.
- Alt, J. R., Gladden, A. B. und Diehl, J. A. (2002). "p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export." The Journal of biological chemistry **277**(10): 8517-8523.
- Aplin, J. D. (1993). "Expression of integrin alpha 6 beta 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells." Placenta **14**(2): 203-215.
- Aplin, J. D., Haigh, T., Jones, C. J., Church, H. J. und Vicovac, L. (1999). "Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin alpha5beta1." Biology of reproduction **60**(4): 828-838.
- Arnholdt, H., Meisel, F., Fandrey, K. und Lohrs, U. (1991). "Proliferation of villous trophoblast of the human placenta in normal and abnormal pregnancies." Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology **60**(6): 365-372.
- Atadja, P., Wong, H., Veillette, C. und Riabowol, K. (1995). "Overexpression of cyclin D1 blocks proliferation of normal diploid fibroblasts." Experimental cell research **217**(2): 205-216.
- Baker, S. J. und Reddy, E. P. (2012). "CDK4: A Key Player in the Cell Cycle, Development, and Cancer." Genes & cancer **3**(11-12): 658-669.
- Barczyk, M., Carracedo, S. und Gullberg, D. (2010). "Integrins." Cell and tissue research **339**(1): 269-280.
- Barker, D. J. und Clark, P. M. (1997). "Fetal undernutrition and disease in later life." Reviews of reproduction **2**(2): 105-112.
- Bartek, J., Bartkova, J. und Lukas, J. (1996). "The retinoblastoma protein pathway and the restriction point." Current opinion in cell biology **8**(6): 805-814.
- Bartkova, J., Lukas, J., Strauss, M. und Bartek, J. (1998). "Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation." Oncogene **17**(8): 1027-1037.
- Benini, S., Perbal, B., Zambelli, D., Colombo, M. P., Manara, M. C., Serra, M., Parenza, M., Martinez, V., Picci, P. und Scotlandi, K. (2005). "In Ewing's sarcoma CCN3(NOV) inhibits proliferation while promoting migration and invasion of the same cell type." Oncogene **24**(27): 4349-4361.
- Biadasiewicz, K., Sonderegger, S., Haslinger, P., Haider, S., Saleh, L., Fiala, C., Pollheimer, J. und Knofler, M. (2011). "Transcription factor AP-2alpha promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast." Endocrinology **152**(4): 1458-1469.
- Bianchi, S., Dotti, M. T. und Federico, A. (2006). "Physiology and pathology of notch signalling system." Journal of cellular physiology **207**(2): 300-308.
- Bilban, M., Tauber, S., Haslinger, P., Pollheimer, J., Saleh, L., Pehamberger, H., Wagner, O. und Knofler, M. (2010). "Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures." Placenta **31**(11): 989-996.

- Bischof, P., Meisser, A. und Campana, A. (2000).** "Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review." Placenta **21 Suppl A**: S55-60.
- Bohr, W., Kupper, M., Hoffmann, K. und Weiskirchen, R. (2010).** "Recombinant expression, purification, and functional characterisation of connective tissue growth factor and nephroblastoma-overexpressed protein." PloS one **5**(12): e16000.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry **72**: 248-254.
- Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L. und Grotendorst, G. R. (1991).** "Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10." The Journal of cell biology **114**(6): 1285-1294.
- Brenner, A. J., Stampfer, M. R. und Aldaz, C. M. (1998).** "Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation." Oncogene **17**(2): 199-205.
- Brigstock, D. R. (2003).** "The CCN family: a new stimulus package." The Journal of endocrinology **178**(2): 169-175.
- Bringold, F. und Serrano, M. (2000).** "Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence." Experimental gerontology **35**(3): 317-329.
- Buck, C. A. und Horwitz, A. F. (1987).** "Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell-substratum adhesion." Journal of cell science. Supplement **8**: 231-250.
- Burton, D. G. (2009).** "Cellular senescence, ageing and disease." Age **31**(1): 1-9.
- Burton, D. G., Sheerin, A. N., Ostler, E. L., Smith, K., Giles, P. J., Lowe, J., Rhys-Williams, W., Kipling, D. G. und Faragher, R. G. (2007).** "Cyclin D1 overexpression permits the reproducible detection of senescent human vascular smooth muscle cells." Annals of the New York Academy of Sciences **1119**: 20-31.
- Cabodi, S., del Pilar Camacho-Leal, M., Di Stefano, P. und Defilippi, P. (2010).** "Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story." Nature reviews. Cancer **10**(12): 858-870.
- Campisi, J. (1997).** "The biology of replicative senescence." European journal of cancer **33**(5): 703-709.
- Canepa, E. T., Scassa, M. E., Ceruti, J. M., Marazita, M. C., Carcagno, A. L., Sirkin, P. F. und Ogara, M. F. (2007).** "INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions." IUBMB life **59**(7): 419-426.
- Caniggia, I., Grisaru-Gravnosky, S., Kuliszewsky, M., Post, M. und Lye, S. J. (1999).** "Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies." The Journal of clinical investigation **103**(12): 1641-1650.
- Cartwright, J. E., Fraser, R., Leslie, K., Wallace, A. E. und James, J. L. (2010).** "Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders." Reproduction **140**(6): 803-813.
- Cartwright, J. E., Holden, D. P. und Whitley, G. S. (1999).** "Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide." British journal of pharmacology **128**(1): 181-189.
- Cartwright, J. E., Tse, W. K. und Whitley, G. S. (2002).** "Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves phosphatidylinositol-3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase." Experimental cell research **279**(2): 219-226.
- Chakraborty, C., Barbin, Y. P., Chakrabarti, S., Chidiac, P., Dixon, S. J. und Lala, P. K. (2003).** "Endothelin-1 promotes migration and induces elevation of [Ca²⁺]_i and phosphorylation of MAP kinase of a human extravillous trophoblast cell line." Molecular and cellular endocrinology **201**(1-2): 63-73.

- Chen, C. C., Chen, N. und Lau, L. F. (2001).** "The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts." The Journal of biological chemistry **276**(13): 10443-10452.
- Chen, C. C. und Lau, L. F. (2009).** "Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins." The international journal of biochemistry & cell biology **41**(4): 771-783.
- Chen, J. S., Huang, X. H., Wang, Q., Chen, X. L., Fu, X. H., Tan, H. X., Zhang, L. J., Li, W. und Bi, J. (2010).** "FAK is involved in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma." Clinical & experimental metastasis **27**(2): 71-82.
- Chen, N., Leu, S. J., Todorovic, V., Lam, S. C. und Lau, L. F. (2004).** "Identification of a novel integrin alphavbeta3 binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogenic activities in vascular endothelial cells." The Journal of biological chemistry **279**(42): 44166-44176.
- Chen, Q. M. (2000).** "Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints." Annals of the New York Academy of Sciences **908**: 111-125.
- Cheng, J. C., Chou, C. H., Kuo, M. L. und Hsieh, C. Y. (2006).** "Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF-kappaB signal transduction pathway." Oncogene **25**(53): 7009-7018.
- Chevalier, G., Yeger, H., Martinerie, C., Laurent, M., Alami, J., Schofield, P. N. und Perbal, B. (1998).** "novH: differential expression in developing kidney and Wilm's tumors." The American journal of pathology **152**(6): 1563-1575.
- Choy, M. Y. und Manyonda, I. T. (1998).** "The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast." Human reproduction **13**(10): 2941-2949.
- Choy, M. Y., St Whitley, G. und Manyonda, I. T. (2000).** "Efficient, rapid and reliable establishment of human trophoblast cell lines using poly-L-ornithine." Early pregnancy **4**(2): 124-143.
- Chu, I. M., Hengst, L. und Slingerland, J. M. (2008).** "The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy." Nature reviews. Cancer **8**(4): 253-267.
- Chung, T. W., Lee, Y. C. und Kim, C. H. (2004).** "Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **18**(10): 1123-1125.
- Church, H. J., Vicovac, L. M., Williams, J. D., Hey, N. A. und Aplin, J. D. (1996).** "Laminins 2 and 4 are expressed by human decidual cells." Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology **74**(1): 21-32.
- Coleman, M. L., Marshall, C. J. und Olson, M. F. (2003).** "Ras promotes p21(Waf1/Cip1) protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation." The EMBO journal **22**(9): 2036-2046.
- Cronier, L., Defamie, N., Dupays, L., Theveniau-Ruissy, M., Goffin, F., Pointis, G. und Malassine, A. (2002).** "Connexin expression and gap junctional intercellular communication in human first trimester trophoblast." Molecular human reproduction **8**(11): 1005-1013.
- Cross, J. C. (1998).** "Formation of the placenta and extraembryonic membranes." Annals of the New York Academy of Sciences **857**: 23-32.
- Damsky, C. H. und Fisher, S. J. (1998).** "Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors." Current opinion in cell biology **10**(5): 660-666.
- Damsky, C. H., Librach, C., Lim, K. H., Fitzgerald, M. L., McMaster, M. T., Janatpour, M., Zhou, Y., Logan, S. K. und Fisher, S. J. (1994).** "Integrin switching regulates normal trophoblast invasion." Development **120**(12): 3657-3666.

- Damsky, C. H. und Werb, Z. (1992). "Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information." Current opinion in cell biology 4(5): 772-781.
- De Falco, M., Cobellis, L., Giraldi, D., Mastrogiamco, A., Perna, A., Colacurci, N., Miele, L. und De Luca, A. (2007). "Expression and distribution of notch protein members in human placenta throughout pregnancy." Placenta 28(2-3): 118-126.
- Desnoyers, L. (2004). "Structural basis and therapeutic implication of the interaction of CCN proteins with glycoconjugates." Current pharmaceutical design 10(31): 3913-3928.
- Devgan, V., Mammucari, C., Millar, S. E., Briskin, C. und Dotto, G. P. (2005). "p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation." Genes & development 19(12): 1485-1495.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. und et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(20): 9363-9367.
- Dong, Y., Jesse, A. M., Kohn, A., Gunnell, L. M., Honjo, T., Zuscik, M. J., O'Keefe, R. J. und Hilton, M. J. (2010). "RBPj κ -dependent Notch signaling regulates mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation during skeletal development." Development 137(9): 1461-1471.
- DuFort, C. C., Paszek, M. J. und Weaver, V. M. (2011). "Balancing forces: architectural control of mechanotransduction." Nature reviews. Molecular cell biology 12(5): 308-319.
- Dulic, V., Drullinger, L. F., Lees, E., Reed, S. I. und Stein, G. H. (1993). "Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(23): 11034-11038.
- Dunphy, W. G. und Newport, J. W. (1988). "Unraveling of mitotic control mechanisms." Cell 55(6): 925-928.
- Dyson, N. (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins." Genes & development 12(15): 2245-2262.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell 75(4): 817-825.
- Ellis, P. D., Metcalfe, J. C., Hyvonen, M. und Kemp, P. R. (2003). "Adhesion of endothelial cells to NOV is mediated by the integrins α v β 3 and α 5 β 1." Journal of vascular research 40(3): 234-243.
- Enders, A. C. (1968). "Fine structure of anchoring villi of the human placenta." The American journal of anatomy 122(3): 419-451.
- Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nakashima, K., Mukudai, Y., Boettiger, D., Pacifici, M., Kurisu, K. und Suzuki, F. (1997). "Involvement of α 5 β 1 integrin in matrix interactions and proliferation of chondrocytes." Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 12(7): 1124-1132.
- Feinberg, R. F., Kao, L. C., Haimowitz, J. E., Queenan, J. T., Jr., Wun, T. C., Strauss, J. F., 3rd und Kliman, H. J. (1989). "Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts. PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts." Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 61(1): 20-26.
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M. und Gessler, M. (2004). "The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development." Genes & development 18(8): 901-911.

- Gaiser, R. (2008).** "Preeclampsia: What's New?" Advances in Anesthesia **26**: 103-119.
- Gale, N. W., Dominguez, M. G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Adams, N. C., Lin, H. C., Holash, J., Thurston, G. und Yancopoulos, G. D. (2004).** "Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(45): 15949-15954.
- Gashaw, I., Stiller, S., Boing, C., Kimmig, R. und Winterhager, E. (2008).** "Premenstrual regulation of the pro-angiogenic factor CYR61 in human endometrium." Endocrinology **149**(5): 2261-2269.
- Gasperowicz, M. und Otto, F. (2008).** "The notch signalling pathway in the development of the mouse placenta." Placenta **29**(8): 651-659.
- Gellhaus, A., Schmidt, M., Dunk, C., Lye, S. J., Kimmig, R. und Winterhager, E. (2006).** "Decreased expression of the angiogenic regulators CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) in human placenta is associated with pre-eclampsia." Molecular human reproduction **12**(6): 389-399.
- Gellhaus, A., Schmidt, M., Dunk, C., Lye, S. J. und Winterhager, E. (2007).** "The circulating proangiogenic factors CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) are significantly decreased in placentae and sera of preeclamptic patients." Reproductive sciences **14**(8 Suppl): 46-52.
- Genbacev, O., Jensen, K. D., Powlin, S. S. und Miller, R. K. (1993).** "In vitro differentiation and ultrastructure of human extravillous trophoblast (EVT) cells." Placenta **14**(4): 463-475.
- Genbacev, O., McMaster, M. T. und Fisher, S. J. (2000).** "A repertoire of cell cycle regulators whose expression is coordinated with human cytotrophoblast differentiation." The American journal of pathology **157**(4): 1337-1351.
- Gleeson, L. M., Chakraborty, C., McKinnon, T. und Lala, P. K. (2001).** "Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **86**(6): 2484-2493.
- Gossen, M. und Bujard, H. (1992).** "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(12): 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. und Bujard, H. (1995).** "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." Science **268**(5218): 1766-1769.
- Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1973).** "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." Virology **52**(2): 456-467.
- Grana, X. und Reddy, E. P. (1995).** "Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)." Oncogene **11**(2): 211-219.
- Gu, Y., Turck, C. W. und Morgan, D. O. (1993).** "Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit." Nature **366**(6456): 707-710.
- Guillemot, F., Caspary, T., Tilghman, S. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Anderson, D. J., Joyner, A. L., Rossant, J. und Nagy, A. (1995).** "Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development." Nature genetics **9**(3): 235-242.
- Haider, S., Pollheimer, J. und Knöfler, M. (2012).** "Notch signaling controls column proliferation, trophoblast invasion and extravillous trophoblast differentiation." In: CTR Annual Trophoblast Meeting 9 – 10th July, 2012 (Abstracts): URL: <http://www.trophoblast.cam.ac.uk/info/Annual%20Trophoblast%20Meeting%20Day%20One%20Abstracts.pdf> (Stand 13.07.2013).

- Handschuh, K., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D. und Fournier, T. (2007).** "Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells." Placenta **28**(2-3): 175-184.
- Haque, I., De, A., Majumder, M., Mehta, S., McGregor, D., Banerjee, S. K., Van Veldhuizen, P. und Banerjee, S. (2012).** "The matricellular protein CCN1/Cyr61 is a critical regulator of Sonic Hedgehog in pancreatic carcinogenesis." The Journal of biological chemistry **287**(46): 38569-38579.
- Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S. und Peters, G. (1996).** "Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence." Molecular and cellular biology **16**(3): 859-867.
- Harbour, J. W. und Dean, D. C. (2000).** "The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms." Genes & development **14**(19): 2393-2409.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J. (1993).** "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell **75**(4): 805-816.
- Harris, L. K. und Aplin, J. D. (2007).** "Vascular remodeling and extracellular matrix breakdown in the uterine spiral arteries during pregnancy." Reproductive sciences **14**(8 Suppl): 28-34.
- Haslinger, P., Haider, S., Sonderegger, S., Otten, J. V., Pollheimer, J., Whitley, G. und Knöfler, M. (2013).** "AKT isoforms 1 and 3 regulate basal and epidermal growth factor-stimulated SGHPL-5 trophoblast cell migration in humans." Biology of reproduction **88**(3): 54.
- Hattori, N., Davies, T. C., Anson-Cartwright, L. und Cross, J. C. (2000).** "Periodic expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) in trophoblast giant cells defines a G2-like gap phase of the endocycle." Molecular biology of the cell **11**(3): 1037-1045.
- Hayflick, L. (1965).** "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." Experimental cell research **37**: 614-636.
- Hayflick, L. und Moorhead, P. S. (1961).** "The serial cultivation of human diploid cell strains." Experimental cell research **25**: 585-621.
- Heath, E., Tahri, D., Andermarcher, E., Schofield, P., Fleming, S. und Boulter, C. A. (2008).** "Abnormal skeletal and cardiac development, cardiomyopathy, muscle atrophy and cataracts in mice with a targeted disruption of the Nov (Ccn3) gene." BMC developmental biology **8**: 18.
- Herr, F., Schreiner, I., Baal, N., Pfarrer, C. und Zygmunt, M. (2011).** "Expression patterns of Notch receptors and their ligands Jagged and Delta in human placenta." Placenta **32**(8): 554-563.
- Hocheeger, H., Takeda, S. und Hunt, T. (2008).** "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?" Nature reviews. Molecular cell biology **9**(11): 910-916.
- Hunkapiller, N. M., Gasperowicz, M., Kapidzic, M., Plaks, V., Maltepe, E., Kitajewski, J., Cross, J. C. und Fisher, S. J. (2011).** "A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia." Development **138**(14): 2987-2998.
- Hunter, T. und Pines, J. (1994).** "Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age." Cell **79**(4): 573-582.
- Hynes, R. O. (2002).** "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.
- Ilic, D., Genbacev, O., Jin, F., Caceres, E., Almeida, E. A., Bellingard-Dubouchaud, V., Schaefer, E. M., Damsky, C. H. und Fisher, S. J. (2001).** "Plasma membrane-

- associated pY397FAK is a marker of cytotrophoblast invasion in vivo and in vitro." The American journal of pathology **159**(1): 93-108.
- Irving, J. A. und Lala, P. K. (1995).** "Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1." Experimental cell research **217**(2): 419-427.
- Jakobsson, L., Bentley, K. und Gerhardt, H. (2009).** "VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning." Biochemical Society transactions **37**(Pt 6): 1233-1236.
- Jauniaux, E., Poston, L. und Burton, G. J. (2006).** "Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution." Human reproduction update **12**(6): 747-755.
- Ji, L., Brkic, J., Liu, M., Fu, G., Peng, C. und Wang, Y. L. (2012).** "Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia." Molecular aspects of medicine.
- Joaquin, M. und Watson, R. J. (2003).** "The cell cycle-regulated B-Myb transcription factor overcomes cyclin-dependent kinase inhibitory activity of p57(KIP2) by interacting with its cyclin-binding domain." The Journal of biological chemistry **278**(45): 44255-44264.
- Johnson, M., Kochhar, K., Nakamura, T. und Iyer, A. (1995).** "Hepatocyte growth factor-induced signal transduction in two normal mouse epithelial cell lines." Biochemistry and molecular biology international **36**(3): 465-474.
- Johnstone, E. D., Mackova, M., Das, S., Payne, S. G., Lowen, B., Sibley, C. P., Chan, G. und Guilbert, L. J. (2005).** "Multiple anti-apoptotic pathways stimulated by EGF in cytotrophoblasts." Placenta **26**(7): 548-555.
- Joliot, V., Martinerie, C., Dambrine, G., Plassiart, G., Brisac, M., Crochet, J. und Perbal, B. (1992).** "Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas." Molecular and cellular biology **12**(1): 10-21.
- Jordan, M., Schallhorn, A. und Wurm, F. M. (1996).** "Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation." Nucleic acids research **24**(4): 596-601.
- Jun, J. I. und Lau, L. F. (2010).** "The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing." Nature cell biology **12**(7): 676-685.
- Kabir-Salmani, M., Fukuda, M. N., Kanai-Azuma, M., Ahmed, N., Shiokawa, S., Akimoto, Y., Sakai, K., Nagamori, S., Kanai, Y., Sugihara, K. und Iwashita, M. (2008).** "The membrane-spanning domain of CD98 heavy chain promotes alpha(v)beta3 integrin signals in human extravillous trophoblasts." Molecular endocrinology **22**(3): 707-715.
- Kabir-Salmani, M., Shiokawa, S., Akimoto, Y., Hasan-Nejad, H., Sakai, K., Nagamatsu, S., Nakamura, Y., Hosseini, A. und Iwashita, M. (2002).** "Characterization of morphological and cytoskeletal changes in trophoblast cells induced by insulin-like growth factor-I." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **87**(12): 5751-5759.
- Kamei, T., Jones, S. R., Chapman, B. M., KL, M. C., Dai, G. und Soares, M. J. (2002).** "The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway modulates the endocrine differentiation of trophoblast cells." Molecular endocrinology **16**(7): 1469-1481.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E. und Sherr, C. J. (1993).** "Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4." Genes & development **7**(3): 331-342.

- Katsube, K., Sakamoto, K., Tamamura, Y. und Yamaguchi, A. (2009).** "Role of CCN, a vertebrate specific gene family, in development." Development, growth & differentiation **51**(1): 55-67.
- Katsuki, Y., Sakamoto, K., Minamizato, T., Makino, H., Umezawa, A., Ikeda, M. A., Perbal, B., Amagasa, T., Yamaguchi, A. und Katsube, K. (2008).** "Inhibitory effect of CT domain of CCN3/NOV on proliferation and differentiation of osteogenic mesenchymal stem cells, Kusa-A1." Biochemical and biophysical research communications **368**(3): 808-814.
- Khong, T. Y., De Wolf, F., Robertson, W. B. und Brosens, I. (1986).** "Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants." British journal of obstetrics and gynaecology **93**(10): 1049-1059.
- Kim, K. H., Chen, C. C., Monzon, R. I. und Lau, L. F. (2013).** "Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts." Molecular and cellular biology **33**(10): 2078-2090.
- King, A., Thomas, L. und Bischof, P. (2000).** "Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report." Placenta **21 Suppl A**: S113-119.
- King, W. G., Mattaliano, M. D., Chan, T. O., Tschlis, P. N. und Brugge, J. S. (1997).** "Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation." Molecular and cellular biology **17**(8): 4406-4418.
- Knöfler, M. (2010).** "Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion." The International journal of developmental biology **54**(2-3): 269-280.
- Knöfler, M. (2013).** "Integration of Notch and Wnt signaling in the control of human extravillous trophoblast differentiation, in: Abstracts for the V SLIMP - IV LASRI Meeting 2013." Placenta **34**(2): A1-A94.
- Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J. W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D. O., Franza, B. R. und Roberts, J. M. (1992).** "Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle." Science **257**(5077): 1689-1694.
- Kondo, T., Ezzat, S. und Asa, S. L. (2006).** "Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia." Nature reviews. Cancer **6**(4): 292-306.
- Kopan, R. und Ilagan, M. X. (2009).** "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." Cell **137**(2): 216-233.
- Korgun, E. T., Celik-Ozenci, C., Acar, N., Cayli, S., Desoye, G. und Demir, R. (2006).** "Location of cell cycle regulators cyclin B1, cyclin A, PCNA, Ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas." Histochemistry and cell biology **125**(6): 615-624.
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G. H., Stark, K. L. und Gridley, T. (2000).** "Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice." Genes & development **14**(11): 1343-1352.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L. und Sharpless, N. E. (2004).** "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging." The Journal of clinical investigation **114**(9): 1299-1307.
- Krude, T., Jackman, M., Pines, J. und Laskey, R. A. (1997).** "Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system." Cell **88**(1): 109-119.
- Kular, L., Pakradouni, J., Kitabgi, P., Laurent, M. und Martinerie, C. (2011).** "The CCN family: a new class of inflammation modulators?" Biochimie **93**(3): 377-388.

- Kuwada, S. K. und Li, X. (2000).** "Integrin $\alpha 5/\beta 1$ mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation." Molecular biology of the cell **11**(7): 2485-2496.
- Kyriakis, J. M. und Avruch, J. (2001).** "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiological reviews **81**(2): 807-869.
- Lala, P. K. und Chakraborty, C. (2003).** "Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury." Placenta **24**(6): 575-587.
- Lala, P. K. und Graham, C. H. (1990).** "Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors." Cancer metastasis reviews **9**(4): 369-379.
- Lala, P. K. und Hamilton, G. S. (1996).** "Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue." Placenta **17**(8): 545-555.
- Lam, C., Lim, K. H. und Karumanchi, S. A. (2005).** "Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia." Hypertension **46**(5): 1077-1085.
- Lau, L. F. (2011).** "CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein." Cellular and molecular life sciences : CMLS **68**(19): 3149-3163.
- Lau, L. F. und Lam, S. C. T. (2005).** "Integrin-mediated CCN functions." Imperial College Press, London In: Perbal B, Takigawa M (eds) CCN proteins: a new family of cell growth and differentiation regulators: 61-79.
- Leask, A. (2013).** "Sonic advance: CCN1 regulates sonic hedgehog in pancreatic cancer." Journal of cell communication and signaling **7**(1): 61-62.
- Leask, A. und Abraham, D. J. (2006).** "All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker." Journal of cell science **119**(Pt 23): 4803-4810.
- Lee, M. H., Reynisdottir, I. und Massague, J. (1995).** "Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution." Genes & development **9**(6): 639-649.
- Lepley, D. M. und Pelling, J. C. (1997).** "Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin." Molecular carcinogenesis **19**(2): 74-82.
- Leu, S. J., Chen, N., Chen, C. C., Todorovic, V., Bai, T., Juric, V., Liu, Y., Yan, G., Lam, S. C. und Lau, L. F. (2004).** "Targeted mutagenesis of the angiogenic protein CCN1 (CYR61). Selective inactivation of integrin $\alpha 6\beta 1$ -heparan sulfate proteoglycan coreceptor-mediated cellular functions." The Journal of biological chemistry **279**(42): 44177-44187.
- Leu, S. J., Liu, Y., Chen, N., Chen, C. C., Lam, S. C. und Lau, L. F. (2003).** "Identification of a novel integrin $\alpha 6\beta 1$ binding site in the angiogenic inducer CCN1 (CYR61)." The Journal of biological chemistry **278**(36): 33801-33808.
- Leu, S. J., Sung, J. S., Chen, M. Y., Chen, C. W., Cheng, J. Y., Wang, T. Y. und Wang, J. J. (2013).** "The Matricellular Protein CCN1 Suppresses Lung Cancer Cell Growth by Inducing Senescence via the p53/p21 Pathway." Journal of cellular biochemistry.
- Lew, D. J., Dulic, V. und Reed, S. I. (1991).** "Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast." Cell **66**(6): 1197-1206.
- Lewis, J. (1998).** "Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates." Seminars in cell & developmental biology **9**(6): 583-589.
- Lin, C. G., Leu, S. J., Chen, N., Tebeau, C. M., Lin, S. X., Yeung, C. Y. und Lau, L. F. (2003).** "CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family." The Journal of biological chemistry **278**(26): 24200-24208.
- Lunghi, L., Ferretti, M. E., Medici, S., Biondi, C. und Vesce, F. (2007).** "Control of human trophoblast function." Reproductive biology and endocrinology : RB&E **5**: 6.

- Lyall, F. (2006).** "Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia." The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology **46**(4): 266-273.
- MacAuley, A., Cross, J. C. und Werb, Z. (1998).** "Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells." Molecular biology of the cell **9**(4): 795-807.
- MacPhee, D. J., Mostachfi, H., Han, R., Lye, S. J., Post, M. und Caniggia, I. (2001).** "Focal adhesion kinase is a key mediator of human trophoblast development." Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology **81**(11): 1469-1483.
- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C. und Hochedlinger, K. (2008).** "A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells." Cell stem cell **3**(3): 340-345.
- Maldonado-Estrada, J., Menu, E., Roques, P., Barre-Sinoussi, F. und Chaouat, G. (2004).** "Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry." Journal of immunological methods **286**(1-2): 21-34.
- Manning, B. D. und Cantley, L. C. (2007).** "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.
- Martinerie, C., Gicquel, C., Louvel, A., Laurent, M., Schofield, P. N. und Le Bouc, Y. (2001).** "Altered expression of novH is associated with human adrenocortical tumorigenesis." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **86**(8): 3929-3940.
- McCallum, L. und Irvine, A. E. (2009).** "CCN3--a key regulator of the hematopoietic compartment." Blood reviews **23**(2): 79-85.
- McFadyen, I. R., Price, A. B. und Geirsson, R. T. (1986).** "The relation of birthweight to histological appearances in vessels of the placental bed." British journal of obstetrics and gynaecology **93**(5): 476-481.
- McKinnon, T., Chakraborty, C., Gleeson, L. M., Chidiac, P. und Lala, P. K. (2001).** "Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **86**(8): 3665-3674.
- McMaster, M. T., Zhou, Y. und Fisher, S. J. (2004).** "Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia." Seminars in nephrology **24**(6): 540-547.
- Miele, L. (2006).** "Notch signaling." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **12**(4): 1074-1079.
- Mo, F. E. und Lau, L. F. (2006).** "The matricellular protein CCN1 is essential for cardiac development." Circulation research **99**(9): 961-969.
- Mo, F. E., Muntean, A. G., Chen, C. C., Stolz, D. B., Watkins, S. C. und Lau, L. F. (2002).** "CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity." Molecular and cellular biology **22**(24): 8709-8720.
- Moore, K. L. (2007).** Embryologie. München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986).** "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology **51 Pt 1**: 263-273.
- Nicola, C., Chirpac, A., Lala, P. K. und Chakraborty, C. (2008).** "Roles of Rho guanosine 5'-triphosphatase A, Rho kinases, and extracellular signal regulated kinase (1/2) in prostaglandin E2-mediated migration of first-trimester human extravillous trophoblast." Endocrinology **149**(3): 1243-1251.
- Noris, M., Perico, N. und Remuzzi, G. (2005).** "Mechanisms of disease: Pre-eclampsia." Nature clinical practice. Nephrology **1**(2): 98-114; quiz 120.

- O'Brien, T. P. und Lau, L. F. (1992).** "Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development." Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research **3**(9): 645-654.
- O'Brien, T. P., Yang, G. P., Sanders, L. und Lau, L. F. (1990).** "Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene." Molecular and cellular biology **10**(7): 3569-3577.
- Ohlsson, R. (1989).** "Growth factors, protooncogenes and human placental development." Cell differentiation and development : the official journal of the International Society of Developmental Biologists **28**(1): 1-15.
- Ouellet, V. und Siegel, P. M. (2012).** "CCN3 modulates bone turnover and is a novel regulator of skeletal metastasis." Journal of cell communication and signaling **6**(2): 73-85.
- Park, C. M., Park, M. J., Kwak, H. J., Lee, H. C., Kim, M. S., Lee, S. H., Park, I. C., Rhee, C. H. und Hong, S. I. (2006).** "Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways." Cancer research **66**(17): 8511-8519.
- Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A. T., Bradley, A., Olson, E. N., Harper, J. W. und Elledge, S. J. (1995).** "p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells." Science **267**(5200): 1024-1027.
- Pateras, I. S., Apostolopoulou, K., Niforou, K., Kotsinas, A. und Gorgoulis, V. G. (2009).** "p57KIP2: "Kip"ing the cell under control." Molecular cancer research : MCR **7**(12): 1902-1919.
- Pennica, D., Swanson, T. A., Welsh, J. W., Roy, M. A., Lawrence, D. A., Lee, J., Brush, J., Taneyhill, L. A., Deuel, B., Lew, M., Watanabe, C., Cohen, R. L., Melhem, M. F., Finley, G. G., Quirke, P., Goddard, A. D., Hillan, K. J., Gurney, A. L., Botstein, D. und Levine, A. J. (1998).** "WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(25): 14717-14722.
- Perbal, B. (2001).** "NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues." Molecular pathology : MP **54**(2): 57-79.
- Perbal, B. (2006).** "NOV story: the way to CCN3." Cell communication and signaling : CCS **4**: 3.
- Perbal, B. (2009).** "Alternative splicing of CCN mRNAs it has been upon us." Journal of cell communication and signaling **3**(2): 153-157.
- Pijnenborg, R., Anthony, J., Davey, D. A., Rees, A., Tiltman, A., Vercruysse, L. und van Assche, A. (1991).** "Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy." British journal of obstetrics and gynaecology **98**(7): 648-655.
- Pijnenborg, R., Bland, J. M., Robertson, W. B. und Brosens, I. (1983).** "Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy." Placenta **4**(4): 397-413.
- Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W. B. und Brosens, I. (1980).** "Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy." Placenta **1**(1): 3-19.
- Pines, J. (1999).** "Four-dimensional control of the cell cycle." Nature cell biology **1**(3): E73-79.
- Pollheimer, J., Bauer, S., Huber, A., Husslein, P., Aplin, J. D. und Knöfler, M. (2004).** "Expression pattern of collagen XVIII and its cleavage product, the angiogenesis inhibitor endostatin, at the fetal-maternal interface." Placenta **25**(10): 770-779.
- Pollheimer, J., Haslinger, P., Fock, V., Prast, J., Saleh, L., Biadasiewicz, K., Jetne-Edelmann, R., Haraldsen, G., Haider, S., Hirtenlehner-Ferber, K. und Knöfler, M.**

- (2011). "Endostatin suppresses IGF-II-mediated signaling and invasion of human extravillous trophoblasts." Endocrinology **152**(11): 4431-4442.
- Pollheimer, J., Husslein, P. und Knöfler, M. (2005).** "Invasive trophoblasts generate regulatory collagen XVIII cleavage products." Placenta **26 Suppl A**: S42-45.
- Pollheimer, J. und Knöfler, M. (2005).** "Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review." Placenta **26 Suppl A**: S21-30.
- Pollheimer, J., Loregger, T., Sonderegger, S., Saleh, L., Bauer, S., Bilban, M., Czerwenka, K., Husslein, P. und Knöfler, M. (2006).** "Activation of the canonical wntless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast." The American journal of pathology **168**(4): 1134-1147.
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M. und Koff, A. (1994).** "p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest." Genes & development **8**(1): 9-22.
- Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P. und Massague, J. (1994).** "Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals." Cell **78**(1): 59-66.
- Porter, A. C. und Vaillancourt, R. R. (1998).** "Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis." Oncogene **17**(11 Reviews): 1343-1352.
- Prast, J., Saleh, L., Husslein, H., Sonderegger, S., Helmer, H. und Knöfler, M. (2008).** "Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling." Endocrinology **149**(3): 979-987.
- Qiu, Q., Basak, A., Mbikay, M., Tsang, B. K. und Gruslin, A. (2005).** "Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(31): 11047-11052.
- Qiu, Q., Yang, M., Tsang, B. K. und Gruslin, A. (2004).** "Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration." Molecular human reproduction **10**(9): 677-684.
- Qiu, Q., Yang, M., Tsang, B. K. und Gruslin, A. (2004).** "EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways." Reproduction **128**(3): 355-363.
- Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M. und Fisher, S. J. (2004).** "Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface." The Journal of clinical investigation **114**(6): 744-754.
- Regnault, T. R., Galan, H. L., Parker, T. A. und Anthony, R. V. (2002).** "Placental development in normal and compromised pregnancies-- a review." Placenta **23 Suppl A**: S119-129.
- Ren, K., Jin, H., Bian, C., He, H., Liu, X., Zhang, S., Wang, Y. und Shao, R. G. (2008).** "MR-1 modulates proliferation and migration of human hepatoma HepG2 cells through myosin light chains-2 (MLC2)/focal adhesion kinase (FAK)/Akt signaling pathway." The Journal of biological chemistry **283**(51): 35598-35605.
- Roca, C. und Adams, R. H. (2007).** "Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling." Genes & development **21**(20): 2511-2524.
- Sacco, A., Pajalunga D., Latella L., Siepi F., Rufini A. und Creszenzi M. (2000).** "Cycle Reactivation in Skeletal Muscle and Other Terminally Differentiated Cells." Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience.

- Sachdev, P., Zeng, L. und Wang, L. H. (2002).** "Distinct role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho family GTPases in Vav3-induced cell transformation, cell motility, and morphological changes." The Journal of biological chemistry **277**(20): 17638-17648.
- Sakamoto, K., Yamaguchi, S., Ando, R., Miyawaki, A., Kabasawa, Y., Takagi, M., Li, C. L., Perbal, B. und Katsube, K. (2002).** "The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway." The Journal of biological chemistry **277**(33): 29399-29405.
- Saleh, L., Prast, J., Haslinger, P., Husslein, P., Helmer, H. und Knofler, M. (2007).** "Effects of different human chorionic gonadotrophin preparations on trophoblast differentiation." Placenta **28**(2-3): 199-203.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989).** "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press (2. Auflage).
- Sang, L., Collier, H. A. und Roberts, J. M. (2008).** "Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1." Science **321**(5892): 1095-1100.
- Schaller, M. D. (2010).** "Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions." Journal of cell science **123**(Pt 7): 1007-1013.
- Schatz, F. und Lockwood, C. J. (1993).** "Progestin regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 in primary cultures of endometrial stromal and decidual cells." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **77**(3): 621-625.
- Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T. und van der Geer, P. (1994).** "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." Nature **372**(6508): 786-791.
- Schluter, K. D., Goldberg, Y., Taimor, G., Schafer, M. und Piper, H. M. (1998).** "Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes." Cardiovascular research **40**(1): 174-181.
- Schober, J. M., Lau, L. F., Ugarova, T. P. und Lam, S. C. (2003).** "Identification of a novel integrin alphaMbeta2 binding site in CCN1 (CYR61), a matricellular protein expressed in healing wounds and atherosclerotic lesions." The Journal of biological chemistry **278**(28): 25808-25815.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. und Lowe, S. W. (1997).** "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.
- Sherr, C. J. (1996).** "Cancer cell cycles." Science **274**(5293): 1672-1677.
- Sherr, C. J. und McCormick, F. (2002).** "The RB and p53 pathways in cancer." Cancer cell **2**(2): 103-112.
- Sherr, C. J. und Roberts, J. M. (1995).** "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases." Genes & development **9**(10): 1149-1163.
- Shiverick, K. T., King, A., Frank, H., Whitley, G. S., Cartwright, J. E. und Schneider, H. (2001).** "Cell culture models of human trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report." Placenta **22 Suppl A**: S104-106.
- Short, S. M., Boyer, J. L. und Juliano, R. L. (2000).** "Integrins regulate the linkage between upstream and downstream events in G protein-coupled receptor signaling to mitogen-activated protein kinase." The Journal of biological chemistry **275**(17): 12970-12977.
- Sibai, B. M. (2003).** "Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia." Obstetrics and gynecology **102**(1): 181-192.
- Sin, W. C., Tse, M., Planque, N., Perbal, B., Lampe, P. D. und Naus, C. C. (2009).** "Matricellular protein CCN3 (NOV) regulates actin cytoskeleton reorganization." The Journal of biological chemistry **284**(43): 29935-29944.
- Sonderegger, S., Haslinger, P., Sabri, A., Leisser, C., Otten, J. V., Fiala, C. und Knöfler, M. (2010).** "Wingless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix

- metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation." *Endocrinology* **151**(1): 211-220.
- Sonderegger, S., Husslein, H., Leisser, C. und Knöfler, M. (2007).** "Complex expression pattern of Wnt ligands and frizzled receptors in human placenta and its trophoblast subtypes." *Placenta* **28 Suppl A**: S97-102.
- Sriuranpong, V., Borges, M. W., Ravi, R. K., Arnold, D. R., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. und Ball, D. W. (2001).** "Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells." *Cancer research* **61**(7): 3200-3205.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T. und Hochedlinger, K. (2008).** "Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse." *Cell stem cell* **2**(3): 230-240.
- Streuli, C. H. und Akhtar, N. (2009).** "Signal co-operation between integrins and other receptor systems." *The Biochemical journal* **418**(3): 491-506.
- Swift, M. R. und Weinstein, B. M. (2009).** "Arterial-venous specification during development." *Circulation research* **104**(5): 576-588.
- Takahashi, A., Ohtani, N. und Hara, E. (2007).** "Irreversibility of cellular senescence: dual roles of p16INK4a/Rb-pathway in cell cycle control." *Cell division* **2**: 10.
- Thibout, H., Martinerie, C., Creminon, C., Godeau, F., Boudou, P., Le Bouc, Y. und Laurent, M. (2003).** "Characterization of human NOV in biological fluids: an enzyme immunoassay for the quantification of human NOV in sera from patients with diseases of the adrenal gland and of the nervous system." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**(1): 327-336.
- Todorovic, V., Chen, C. C., Hay, N. und Lau, L. F. (2005).** "The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts." *The Journal of cell biology* **171**(3): 559-568.
- Toussaint, O., Medrano, E. E. und von Zglinicki, T. (2000).** "Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes." *Experimental gerontology* **35**(8): 927-945.
- Towbin, H. und Gordon, J. (1984).** "Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook." *Journal of immunological methods* **72**(2): 313-340.
- Toyoshima, H. und Hunter, T. (1994).** "p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21." *Cell* **78**(1): 67-74.
- Tureckova, J., Vojtechova, M., Krausova, M., Sloncova, E. und Korinek, V. (2009).** "Focal adhesion kinase functions as an akt downstream target in migration of colorectal cancer cells." *Translational oncology* **2**(4): 281-290.
- Ullah, Z., de Renty, C. und DePamphilis, M. L. (2011).** "Checkpoint kinase 1 prevents cell cycle exit linked to terminal cell differentiation." *Molecular and cellular biology* **31**(19): 4129-4143.
- Ullah, Z., Lee, C. Y. und Depamphilis, M. L. (2009).** "Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy." *Cell division* **4**: 10.
- Ullmannova, V., Stockbauer, P., Hradcova, M., Soucek, J. und Haskovec, C. (2003).** "Relationship between cyclin D1 and p21(Waf1/Cip1) during differentiation of human myeloid leukemia cell lines." *Leukemia research* **27**(12): 1115-1123.
- van Dijk, M., Drewlo, S. und Oudejans, C. B. (2010).** "Differential methylation of STOX1 in human placenta." *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **5**(8): 736-742.
- Varanou, A., Withington, S. L., Lakasing, L., Williamson, C., Burton, G. J. und Hemberger, M. (2006).** "The importance of cysteine cathepsin proteases for placental development." *Journal of molecular medicine* **84**(4): 305-317.
- Vicovac, L., Jones, C. J. und Aplin, J. D. (1995).** "Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a model of the early human placenta in vitro." *Placenta* **16**(1): 41-56.

- Wagener, J., Yang, W., Kazuschke, K., Winterhager, E. und Gellhaus, A. (2013). "CCN3 regulates proliferation and migration properties in Jeg3 trophoblast cells via ERK1/2, Akt and Notch signalling." Molecular human reproduction **19**(4): 237-249.
- Wang, H. B., Dembo, M., Hanks, S. K. und Wang, Y. (2001). "Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(20): 11295-11300.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-330.
- Werb, Z. (1997). "ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology." Cell **91**(4): 439-442.
- Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T. und Artavanis-Tsakonas, S. (1985). "Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats." Cell **43**(3 Pt 2): 567-581.
- Winterhager, E., Von Ostau, C., Gerke, M., Gruemmer, R., Traub, O. und Kaufmann, P. (1999). "Connexin expression patterns in human trophoblast cells during placental development." Placenta **20**(8): 627-638.
- Wolf, N., Yang, W., Dunk, C. E., Gashaw, I., Lye, S. J., Ring, T., Schmidt, M., Winterhager, E. und Gellhaus, A. (2010). "Regulation of the matricellular proteins CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) by hypoxia-inducible factor-1{alpha} and transforming-growth factor-{beta}3 in the human trophoblast." Endocrinology **151**(6): 2835-2845.
- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C. E., Norton, C. R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E. B., Weinmaster, G. und Gridley, T. (1999). "Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1." Human molecular genetics **8**(5): 723-730.
- Yan, Y., Frisen, J., Lee, M. H., Massague, J. und Barbacid, M. (1997). "Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development." Genes & development **11**(8): 973-983.
- Yang, G. P. und Lau, L. F. (1991). "Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface." Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research **2**(7): 351-357.
- Yang, W., Wagener, J., Wolf, N., Schmidt, M., Kimmig, R., Winterhager, E. und Gellhaus, A. (2011). "Impact of CCN3 (NOV) glycosylation on migration/invasion properties and cell growth of the choriocarcinoma cell line Jeg3." Human reproduction **26**(10): 2850-2860.
- Zhao, W. X. und Lin, J. H. (2012). "Notch signaling pathway and human placenta." International journal of medical sciences **9**(6): 447-452.
- Zhou, Y., Damsky, C. H. und Fisher, S. J. (1997). "Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?" The Journal of clinical investigation **99**(9): 2152-2164.
- Zhou, Y., Fisher, S. J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M. und Damsky, C. H. (1997). "Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?" The Journal of clinical investigation **99**(9): 2139-2151.
- Zhou, Y., Genbacev, O., Damsky, C. H. und Fisher, S. J. (1998). "Oxygen regulates human cytotrophoblast differentiation and invasion: implications for endovascular invasion in normal pregnancy and in pre-eclampsia." Journal of reproductive immunology **39**(1-2): 197-213.

- Zuo, G. W., Kohls, C. D., He, B. C., Chen, L., Zhang, W., Shi, Q., Zhang, B. Q., Kang, Q., Luo, J., Luo, X., Wagner, E. R., Kim, S. H., Restegar, F., Haydon, R. C., Deng, Z. L., Luu, H. H., He, T. C. und Luo, Q. (2010).** "The CCN proteins: important signaling mediators in stem cell differentiation and tumorigenesis." Histology and histopathology **25**(6): 795-806.
- Zybina, T. G., Kaufmann, P., Frank, H. G., Freed, J., Kadyrov, M. und Biesterfeld, S. (2002).** "Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of differentiation and invasion into endometrium and myometrium. I. Dynamics of polyploidization." Tsitologija **44**(11): 1058-1067.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die CCN Proteine CCN1 (CYR61) und CCN3 (NOV): Regulatoren der Trophoblastproliferation und -migration“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Friederike Kipkeew befürworte.

Essen, den 12.09.2013

Prof. Dr. rer. nat. Elke Winterhager

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 12.09.2013

Friederike Kipkeew

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 12.09.2013

Friederike Kipkeew

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die mich bei der Durchführung meiner Doktorarbeit unterstützt haben!

Prof. Dr. rer. nat. Elke Winterhager danke ich für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die intensive fachliche Betreuung und Unterstützung sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei PD Dr. rer. nat. Alexandra Gellhaus bedanke ich mich für die intensive fachliche Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit.

Dr. rer. nat. Manuela Wülling danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und wertvollen Ratschläge in Bezug auf die Zellzyklusanalysen.

Bei Dr. rer. nat. Diana Klein bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und für die Durchführung der FACS-Analysen.

Ursula Schmücker, Gabriele Sehn und Kathrin Kazuschke danke ich für die exzellente technische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Molekularbiologie für die herzliche Aufnahme und die angenehme Zusammenarbeit. Ich möchte mich besonders bei Yvonne Koch, Dr. rer. nat. Jessica Wagener und Stephanie Kaiser bedanken, die mit mir zusammen promovierten und immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir bei Schwierigkeiten durch ihre ständige Diskussionsbereitschaft weiterhalfen.